

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
ALIMENTOS**

**IMOBILIZAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE (LACTOZYM[®]) EM EUPERGIT[®] C E SUA
CARACTERIZAÇÃO**

Eng^a Graciella da Silva Campello

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos necessários para obtenção do
título de Mestre em Engenharia e Ciência
de Alimentos

Prof. Dr. Carlos André Veiga Burkert
Orientador

**RIO GRANDE, RS
2010**

Esse trabalho é dedicado aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal do Rio Grande (FURG) pela oportunidade de fazer parte da história desta importante instituição pública de ensino e pesquisa, composta de cidadãos em busca de conhecimento e formadora de profissionais de qualidade.

Agradeço aos professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos – PPGECA, pela compreensão e atenção constante conosco, estudantes, em especial, ao Prof. Carlos André pela orientação e pelas palavras de incentivo, apoio – e cobrança, quando necessárias. À Prof^a. Janaína pelo apoio no planejamento experimental e expressão dos resultados. À equipe da secretaria do Programa, em especial à Islanda.

Agradeço às minhas companheiras de trabalho em laboratório, Renata e Tatiane, as quais foram meus braços direito e esquerdo – não necessariamente nesta ordem – muito importantes ao longo do trabalho, e que considero duas novas amigas muito especiais em minha vida. Aos colegas pelo convívio e amizade, especialmente ao Chico, com quem tive o prazer de compartilhar o trabalho em laboratório, o estágio de docência e as alegrias no decorrer desta etapa. Às colegas Carolina e Renata, que me acompanharam desde a graduação. Aos demais integrantes do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da FURG, muito especialmente à querida Elisane, por suas palavras de carinho e incentivo e a sua constante alegria e dedicação.

Agradeço, finalmente, às pessoas que realmente permitiram a realização deste sonho: meus pais, os quais nutriram, desde pequena, meu desejo de sabedoria e conhecimento, acreditaram no meu potencial e sempre me apoiaram em todas as decisões. Agradeço, de coração, à minha mãe, que trabalhou, sofreu e se sacrificou durante anos em prol do futuro dos filhos, e hoje descansa, aposentada, colhendo os frutos que plantou. Agradeço a toda minha família e, principalmente, a quem esteve sempre ao meu lado, Fabiano, aturando bravamente a inconstância de uma futura Mestra.

À FAPERGS, pela concessão de auxílio financeiro, e à CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS _____	vii
LISTA DE FIGURAS _____	viii
RESUMO _____	ix
ABSTRACT _____	x
CAPÍTULO I _____	1
1 – INTRODUÇÃO _____	2
2 – OBJETIVOS _____	4
CAPÍTULO II _____	5
2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA _____	6
2.1 – Enzimas _____	6
2.1.1 – Considerações gerais _____	6
2.1.2 – β -galactosidase _____	7
2.2 – Aspectos de Enzimologia _____	8
2.2.1 – Atividade enzimática _____	8
2.2.2 – Influência do meio sobre a atividade enzimática _____	9
2.2.2.1 – Influência do pH sobre a atividade enzimática _____	9
2.2.2.2 – Influência da temperatura sobre a atividade enzimática _____	10
2.2.2.3 – Termodinâmica da desnaturação enzimática _____	12
2.2.2.4 – Efeito da concentração de substrato sobre a atividade enzimática _____	13
2.3 – Imobilização de Enzimas _____	14
2.3.1 – Considerações gerais _____	14
2.3.2 – Métodos de imobilização _____	17
2.3.2.1 – Retenção física _____	17
2.3.2.2 – União química _____	18
2.3.3 – Tipos de suportes para imobilização de enzimas _____	19
2.3.3.1 – Imobilização utilizando Alginato de Cálcio como suporte _____	21
2.3.3.2 – Imobilização utilizando Eupergit® C como suporte _____	22
2.3.3.3 – Imobilização utilizando Quitosana como suporte _____	23
2.4 – Reator de Leito Fixo para Imobilização de Enzimas _____	25
2.5 – Efeitos Causados pela Imobilização Enzimática _____	25
2.6 – Imobilização de β -galactosidase _____	27
CAPÍTULO III _____	31
3 – MATERIAL E MÉTODOS _____	32

3.1 – Material	32
3.1.1 – Enzima	32
3.1.2 – Suportes	32
3.1.3 – Reagentes	32
3.2 – Métodos	32
3.2.1 – Testes preliminares de imobilização	32
3.2.1.1 – Imobilização utilizando Eupergit® C como suporte	32
3.2.1.2 - Imobilização utilizando Quitosana como suporte	33
3.2.1.3 – Imobilização utilizando Alginato de Cálcio como suporte	33
3.2.1.4 – Avaliação dos resultados	33
3.2.2 – <i>Screening</i> de variáveis na imobilização - Planejamento Plackett-Burman	34
3.2.3 – Caracterização da enzima livre e imobilizada	34
3.2.3.1 – Determinação do perfil de pH	34
3.2.3.2 – Determinação do perfil de temperatura	35
3.2.3.3 – Estabilidade térmica	35
3.2.3.4 – Determinação dos parâmetros cinéticos K_m e $V_{máx}$	36
3.2.3.5 – Determinação dos parâmetros termodinâmicos	36
3.2.4 – Métodos analíticos	37
3.2.4.1 – Determinação da atividade de β -galactosidase livre e imobilizada utilizando como substrato lactose	37
CAPÍTULO IV	38
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1 – Ensaio Preliminares de Imobilização	39
4.2 – Planejamento Plackett-Burman para Imobilização em Eupergit® C	40
4.3 – Caracterização das Enzimas Livre e Imobilizada	43
4.3.1 – Determinação do perfil de pH	43
4.3.2 – Determinação do perfil de temperatura	44
4.3.3 – Cálculo da energia de ativação pela equação de Arrhenius	46
4.3.4 – Estabilidade térmica da enzima	48
4.3.4.1 - Cálculo da energia de ativação para a reação de desnaturação	48
4.3.4.2 – Meia-vida	51
4.3.5 - Determinação dos parâmetros cinéticos K_m e $V_{máx}$	52
4.3.6 - Determinação dos parâmetros termodinâmicos	56
CAPÍTULO V	59
5 – CONCLUSÕES	60

CAPÍTULO VI	61
6 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	62
CAPÍTULO VII	63
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: Classificação de suportes inertes.	20
Tabela 4.1: Testes preliminares de imobilização de β -galactosidase de <i>Kluyveromyces lactis</i> (Lactozym®) em diferentes suportes e análise estatística dos resultados (teste t)*.	39
Tabela 4.2: Matriz do Planejamento Plackett & Burman para a imobilização de β -galactosidase de <i>Kluyveromyces lactis</i> (Lactozym®) com valores codificados (reais) e recuperação da atividade enzimática.	40
Tabela 4.3: Efeitos principais das variáveis sobre a recuperação da atividade enzimática.	41
Tabela 4.4: Dados usados na construção do gráfico $\ln(V)$ versus $10^3/T$ para o cálculo da energia de ativação para a enzima β -galactosidase na forma livre.	46
Tabela 4.5: Dados usados na construção do gráfico $\ln(V)$ versus $10^3/T$ para o cálculo da energia de ativação para a enzima β -galactosidase na forma imobilizada.	46
Tabela 4.6: Dados usados na construção do gráfico $-\ln(K_d)$ versus $10^3/T$ (K^{-1}) para o cálculo da energia de ativação da reação de desnaturação para a enzima β -galactosidase na forma livre.	49
Tabela 4.7: Dados usados na construção do gráfico $-\ln(K_d)$ versus $10^3/T$ (K^{-1}) para o cálculo da energia de ativação da reação de desnaturação para a enzima β -galactosidase na forma imobilizada.	49
Tabela 4.8: Tempos de meia-vida para enzima livre e imobilizada nas diferentes temperaturas e fatores de estabilização (F).	51
Tabela 4.9: Parâmetros termodinâmicos (ΔH , ΔG e ΔS) para as enzimas livre e imobilizada.	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Estrutura molecular do polissacarídeo alginato.	21
Figura 2.2: Estrutura da Eupergit® C e a imobilização covalente de uma enzima.	22
Figura 2.3: Estrutura química do polissacarídeo quitosana.	24
Figura 4.1: Perfil de pH para β -galactosidase livre e imobilizada (valores médios de três experimentos).	43
Figura 4.2: Perfil de temperatura para β -galactosidase livre e imobilizada (valores médios de três experimentos).	45
Figura 4.3: Efeito da temperatura na atividade de β -galactosidase de <i>Kluyveromyces lactis</i> (Lactozym®) livre para o cálculo da energia de ativação.	47
Figura 4.4: Efeito da temperatura na atividade de β -galactosidase de <i>Kluyveromyces lactis</i> (Lactozym®) imobilizada para o cálculo da energia de ativação.	47
Figura 4.5: Dados experimentais das constantes de desnaturação térmica (K_d) em função da temperatura para o cálculo da energia de ativação da reação de desnaturação (E_d) da enzima livre	50
Figura 4.6: Dados experimentais das constantes de desnaturação térmica (K_d) em função da temperatura para o cálculo da energia de ativação da reação de desnaturação (E_d) da enzima imobilizada.	50
Figura 4.7: Diagrama de Lineweaver-Burk aplicado aos dados experimentais para β -galactosidase livre.	53
Figura 4.8: Diagrama de Lineweaver-Burk aplicado aos dados experimentais para β -galactosidase imobilizada.	53
Figura 4.9: Valores experimentais e preditos pelo modelo de Michaelis-Menten para atividade enzimática em função da concentração de lactose (β -galactosidase livre).	54
Figura 4.10: Valores experimentais e preditos pelo modelo de Michaelis-Menten para atividade enzimática em função da concentração de lactose (β -galactosidase imobilizada).	55

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo principal investigar a imobilização da enzima β -galactosidase comercial de *Kluyveromyces lactis* (Lactozym[®]), bem como caracterizar a enzima livre e imobilizada visando sua aplicação na reação de hidrólise da lactose. Foram feitos testes preliminares com três suportes diferentes para a imobilização (alginato, quitosana e Eupergit[®] C), sendo que os valores de recuperação da atividade enzimática foram, respectivamente, 2,43%, 6,27% e 41,86%, selecionando-se o suporte Eupergit[®] C como o mais promissor. Um planejamento Plackett-Burman, correspondente a 12 ensaios mais 3 réplicas no ponto central, foi proposto a fim de verificar os efeitos das variáveis temperatura, pH, força iônica, tempo de imobilização, concentração de galactose, concentração de íons Mg^{2+} e volume de enzima na imobilização de β -galactosidase em Eupergit[®] C. A força iônica e o pH foram as variáveis que apresentaram efeito significativo ($p < 0,1$) na imobilização, sendo que o aumento da força iônica de 0,1 M para 1,5 M e o aumento do pH de 6,6 para 7,4 representaram aumento de 30,0% e redução de 17,3% na recuperação da atividade enzimática, respectivamente. À temperatura de 25 °C, pH 6,6, concentração salina de 1,5 M, tempo de imobilização de 8 h, concentração de Mg^{2+} de 1 mM e 0,4 mL de enzima adicionada, atingiu-se 85% de recuperação da atividade enzimática. As enzimas livre e imobilizada, nas melhores condições em Eupergit[®] C, foram caracterizadas quanto aos perfis de pH e temperatura, estabilidade térmica, parâmetros cinéticos e termodinâmicos. Quanto aos perfis de pH e temperatura, foram obtidos, para ambas, valores máximos de atividade enzimática em pH 6,6 e 45 °C. Houve um ganho de estabilidade térmica com a imobilização enzimática, tendo-se observado um aumento de cerca de 4 vezes no tempo de meia-vida da enzima imobilizada a 45 °C, em relação à livre, o que pode representar vantagens na utilização da enzima imobilizada em escala comercial. Os valores de energia de ativação para as enzimas livre e imobilizada foram, respectivamente, iguais a 35,28 kJ.mol⁻¹ e 29,46 kJ.mol⁻¹; e os valores de energia de ativação da reação de desnaturação para as enzimas livre e imobilizada foram iguais, respectivamente, a 266,12 kJ.mol⁻¹ e 198,77 kJ.mol⁻¹. Foram determinados os parâmetros cinéticos para as enzimas livre e imobilizada, sendo que os valores de K_m , 30,33 mM e 104,00 mM, respectivamente, representaram uma diminuição da afinidade da enzima pelo substrato com a imobilização, possivelmente devido a fatores estéricos e conformacionais. Parâmetros termodinâmicos foram calculados, evidenciando novamente a maior estabilidade térmica da enzima imobilizada e indicando que a perda de estabilidade de ambas as enzimas, livre e imobilizada, parece não estar associada a alterações relevantes na estrutura terciária.

Palavras-chave: β -galactosidase, imobilização, hidrólise da lactose, propriedades térmicas e bioquímicas.

ABSTRACT

Immobilization of β -galactosidase (Lactozym[®]) on Eupergit[®] C and its characterization

This study aimed to investigate the immobilization of commercial β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* (Lactozym[®]) and characterize the free and immobilized enzymes for their application in lactose hydrolysis. Three preliminary tests were carried out with three different supports for immobilization (alginate, chitosan and Eupergit[®] C), and the values for recovery of enzyme activity were, respectively, 2.43%, 6.27% e 41.86%, selecting Eupergit[®] C as the most promising. A Plackett-Burman design, composed of 12 assays over 3 central points was proposed in order to verify the effects of temperature, pH, ionic strength, reaction time, galactose concentration, Mg^{2+} concentration and enzyme volume on β -galactosidase immobilization using Eupergit[®] C support. The ionic strength and pH were the variables that presented significant effect ($p < 0.1$) on immobilization. The increase in the ionic strength from 0.1 to 1.5 M and the decrease in pH from 6.6 to 7.4 represented an increase of 30.0% and a reduction of 17.3% in the recovery of enzyme activity, respectively. At 25°C, pH 6.6, salt concentration of 1.5 M, immobilization for 8 h, 1 mM Mg^{2+} and 0.4 mL of enzyme added, reached 85% recovery of enzymatic activity. The free and immobilized enzyme on Eupergit[®] C were characterized, determining pH and temperature profiles, thermal stability, kinetic and thermodynamic parameters. pH and temperature profiles showed maximum activity at pH 6.6 and 45°C. There was a gain in thermal stability with the enzyme immobilization and there was an increase of about 4 times in the half-life of immobilized enzyme at 45°C, which may represent advantages when using in a commercial scale. The values of activation energy for free and immobilized enzymes were, respectively, equal to 35.28 kJ.mol⁻¹ and 29.46 kJ.mol⁻¹, and the values of activation energy of denaturation reaction for free and immobilized enzymes were equal, respectively, to 266.12 kJ.mol⁻¹ and 198.77 kJ.mol⁻¹. Kinetic parameters were determined for the immobilized and free enzyme. K_m values of 30.33 mM and 104.00 mM, respectively, represented a decrease of the affinity of the enzyme by the substrate with immobilization, possibly due to steric and conformational factors. Thermodynamic parameters were calculated, showing the higher thermal stability of the immobilized enzyme and indicating that the loss of stability of both enzymes, immobilized and free, does not seem to be associated with significant changes in tertiary structure.

Keywords: β -galactosidase, immobilization, lactose hydrolysis, biochemical and thermal properties.

CAPÍTULO I
INTRODUÇÃO

1 – INTRODUÇÃO

Praticamente todas as reações químicas que se processam nos organismos são catalisadas. Os catalisadores biológicos são proteínas chamadas enzimas (BORZANI et al., 2001). As enzimas atuam acelerando uma reação termodinamicamente possível sem alterar a constante de equilíbrio e a energia livre de reação (BAILEY & OLLIS, 1986). Dentre as enzimas empregadas nas indústrias de alimentos, destaca-se o uso da enzima β -galactosidase (lactase) no processamento de leite e de seus derivados lácteos (GÉKAS & LOPEZ-LEIVA, 1985; REED & NAGODAWITHANA, 1993; LADERO et al., 2000).

O interesse em produtos lácteos com os menores teores possíveis de lactose também está associado a um aspecto vinculado à saúde humana: o significativo percentual de indivíduos intolerantes à lactose. A intolerância à lactose é pouco comum em crianças de origem caucasiana (brancos originários da Europa), ocorrendo em maior frequência em crianças de outras origens, como africanos, asiáticos, aborígenes da Oceania e ameríndios (ROBERFROID & DELZENNE, 1998, citados por MARTINS & BURKERT, 2009). Na população humana adulta os índices de intolerância à lactose são elevados, sendo estimados em 70% na América do Sul e África, podendo chegar próximo de 100% em alguns países da Ásia, como na China e na Tailândia (SWALLOW, 2003, citado por MARTINS & BURKERT, 2009). Não existem dados oficiais sobre o percentual de brasileiros que sofrem desse problema, no entanto estima-se em mais de 58 milhões a população intolerante à lactose no Brasil (CUNHA et al., 2007, citados por MARTINS & BURKERT, 2009).

Desta forma, a remoção da lactose presente no leite, seus derivados e no soro, pela ação da β -galactosidase, constitui na atualidade uma importante operação unitária da indústria de alimentos (MARIOTTI et al., 2008).

A lactose é um dissacarídeo que, ao sofrer hidrólise, forma como produtos a glicose e a galactose. Industrialmente, a reação é catalisada pela enzima β -galactosidase (β -D-galactosídeo galactohidrolase, EC 3.2.1.23). Quantidades consideráveis de oligossacarídeos também são formadas durante a reação, sendo estes considerados prebióticos por estimularem a microflora intestinal humana (MARTINS & BURKERT, 2009).

No entanto, um dos fatores limitantes para o uso desta tecnologia enzimática em larga escala reside no alto custo da enzima β -galactosidase. Uma das alternativas tecnológicas é o uso de enzimas imobilizadas.

De acordo com Bickerstaff (1997), imobilização é a técnica que confina uma enzima com atividade catalítica de interesse em um sistema, impedindo sua migração para o meio, ou fase móvel, onde se encontram o substrato e o produto, pois a enzima fica física ou quimicamente associada a um suporte insolúvel. A aplicação comercial de β -galactosidase imobilizada ainda é pouco explorada, o que tem atraído o interesse de inúmeros pesquisadores.

As enzimas imobilizadas podem ser recuperadas após uma batelada, garantindo sua reutilização em bateladas posteriores, reduzindo drasticamente os custos deste insumo, sendo desta forma um fator determinante da viabilização comercial do processo. O uso de β -galactosidase imobilizada também permite a implantação de sistemas contínuos de produção, com expressivos ganhos de produtividade (MARIOTTI et al., 2008). Além disso, as enzimas estão sujeitas à inativação por fatores físicos, químicos ou biológicos, podendo ocorrer quando estocadas ou durante o uso. Para que a catálise seja eficiente em um determinado processo, há a necessidade de protegê-las da interação com o solvente do meio reacional, pois o mesmo pode provocar a inativação da enzima. As técnicas de imobilização fornecem estabilidade às enzimas, principalmente frente ao pH e temperatura, diminuindo os custos operacionais e possibilitando novas aplicações biotecnológicas (NERI, 2008).

Por outro lado, as desvantagens mais notórias da imobilização incluem a aleatoriedade da interação suporte-enzima, o alto custo do suporte, a dessorção das enzimas com o uso, a redução da atividade catalítica devido aos efeitos difusionais, de microambiente e estéreo-conformacionais (REGULY, 2000).

Existem inúmeros materiais inertes que podem ser usados para imobilizar enzimas. A natureza física desses suportes pode variar, desde materiais geleiformes (alginato, álcool polivinílico, carragenana) até superfícies sólidas (pérolas de vidro poroso, Eupergit[®] C, grafite) (LIMA et al., 2001).

Portanto, a utilização de enzimas imobilizadas como catalisadores do processo vêm justamente tentar reduzir ou, até mesmo, eliminar os entraves que limitam o emprego de enzimas solúveis em aplicações industriais, tais como instabilidade operacional, custos e dificuldade de sua recuperação (SANGEETHA et al., 2005).

2 – OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo principal investigar a imobilização da enzima β -galactosidase comercial de *Kluyveromyces lactis* (Lactozym[®]) tendo como objetivos específicos:

- Testar os suportes Eupergit[®] C, quitosana e alginato na imobilização de β -galactosidase comercial, selecionando aquele mais promissor para a imobilização da enzima;

- Verificar os efeitos das variáveis temperatura, pH, força iônica, tempo de imobilização, concentração de galactose, concentração de íons Mg^{2+} e volume de enzima na recuperação da atividade enzimática com a imobilização em Eupergit[®] C;

- Verificar os efeitos do pH e temperatura na atividade enzimática sobre hidrólise da lactose, comparando enzima livre e imobilizada em Eupergit[®] C;

- Verificar a estabilidade térmica da enzima imobilizada em Eupergit[®] C, comparando-a com a enzima livre;

- Determinar os parâmetros cinéticos e termodinâmicos da enzima imobilizada em Eupergit[®] C e da enzima livre.

CAPÍTULO II
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – Enzimas

2.1.1 – Considerações gerais

Praticamente todas as reações químicas que se processam nos organismos são catalisadas. Os catalisadores biológicos são proteínas chamadas enzimas. A catálise das reações biológicas é imprescindível para a conservação e reprodução dos seres vivos, uma vez que a maioria das reações químicas que ocorrem nos organismos tem, na ausência de catalisadores, velocidades muito baixas (BORZANI et al., 2001).

As enzimas são formadas dentro das células de todos os seres vivos, plantas, fungos e bactérias. São elas que controlam várias funções vitais incluindo os processos metabólicos que convertem nutrientes em energia e em novos materiais para as células, além de acelerar a reação dos processos bioquímicos, tornando-os mais eficientes (LEHNINGER, 1997).

As enzimas atuam acelerando uma reação termodinamicamente possível, sem alterar a constante de equilíbrio e a energia livre de reação. Uma das diferenças básicas entre enzimas e catalisadores químicos sintéticos é a capacidade daquelas em catalisar reações sob condições suaves, em soluções aquosas, à temperatura e pressão normais, reduzindo a possibilidade de alteração de compostos sensíveis ao calor, bem como reduzindo as necessidades energéticas e os efeitos de corrosão do processo (BAILEY & OLLIS, 1986).

De fato, as reações catalisadas por enzimas têm velocidades muito altas, entre 10^6 e 10^{12} vezes maiores que as reações não catalisadas e algumas ordens de grandeza maiores que as reações catalisadas por catalisadores inorgânicos (BORZANI et al., 2001).

Tanto os catalisadores químicos, como os biológicos, perdem gradualmente sua atividade ao participar das reações que catalisam. As enzimas, de um modo geral, são mais frágeis, porém a adição de enzimas aos produtos, principalmente nas indústrias de alimentos e de rações, contribui modificando matérias-primas e/ou obtendo produtos específicos, destacando-se os usos em panificação, na modificação de materiais amiláceos, na fabricação de sucos de frutas, na modificação de proteínas, na fabricação de bebidas alcoólicas e de laticínios (VITOLLO, 2001).

A disponibilidade de enzimas industriais também está condicionada à estocagem ou armazenamento do produto enzimático, o qual depende da conservação do mesmo; ou seja, a estabilidade da enzima. As enzimas em dispersão aquosa são intrinsecamente instáveis e altamente sensíveis a temperaturas crescentes, na maioria dos casos. Isto ocorre porque a célula contém um rígido condicionamento ambiental (temperatura, pH, concentração iônica, potencial redox) assegurando a conformação terciária ou quaternária, natural, da proteína-enzima. A estabilidade desta conformação é precária, momentânea, pois é decorrente do equilíbrio de forças não covalentes, como pareamento eletrostático (pontes salinas), interações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio, todas forças fracas, que permitem a ligação e o desligamento quase instantâneo da enzima com o seu substrato, formando o complexo enzima-substrato, o qual é responsável pela diminuição da energia de ativação, necessária às reações químicas, nas quais há troca de ligações covalentes. O conhecimento da constituição de determinada enzima ou, ao menos, da existência de determinados grupos, resíduos ou íons, o que hoje ocorre com a maioria das enzimas classificadas, permite exercer um controle sobre o mecanismo de ativação, desativação e inibição (REGULY, 2000).

2.1.2 – β -galactosidase

Dentre as enzimas empregadas nas indústrias de alimentos, destaca-se o uso da enzima β -galactosidase (lactase) no processamento de leite e de seus derivados lácteos (GÉKAS & LOPEZ-LEIVA, 1985; REED & NAGODAWITHANA, 1993; LADERO et al., 2000).

β -galactosidase (β -D-galactosídeo galactohidrolase, ou lactase, EC 3.2.1.23) é amplamente distribuída em plantas, animais e microrganismos. A β -galactosidase é conhecida por catalisar a hidrólise de β -D-galactopiranosídeos, incluindo lactose, assim como reações de transgalactosilação, por exemplo, para produzir galacto-oligossacarídeos (GOS) quando lactose ou qualquer outro receptor galactosil apropriado é usado (NAKAYAMA & AMACHI, 1999, citados por NAKKHARAT & HALTRICH, 2006).

O tratamento da lactose presente no leite, seus derivados e no soro, pela ação da β -galactosidase, é hoje motivo de estudo para muitos pesquisadores. Esse tratamento torna o leite adequado para a alimentação de indivíduos intolerantes à lactose. Além disso, as β -galactosidases são também galactosiltransferases,

enriquecendo os produtos lácteos com galacto-oligosacarídeos, motivando importantes pesquisas a partir da última década (REUTER et al., 1999; ALMEIDA & PASTORE, 2001).

Esta enzima é amplamente usada na tecnologia de alimentos devido a várias aplicações de ingredientes com lactose reduzida em alimentos. Laticínios com lactose-reduzida ou lactose-livre têm a vantagem de serem mais facilmente digeríveis por aquelas pessoas que são intolerantes à lactose e têm dificuldades em consumir leite e produtos lácteos (GREENBERG & MAHONEY, 1981; GEKAS & LOPEZ-LEIVA, 1985, citados por NAKKHARAT & HALTRICH, 2006).

A hidrólise enzimática da lactose pode ser realizada tanto por enzimas livres como por imobilizadas. A utilização da enzima β -galactosidase livre e imobilizada tem recebido bastante atenção em indústrias alimentícias para hidrolisar a lactose (GEKAS & LÓPEZ-LEIVA, 1985). Considerações adicionais indicam que o uso desta enzima imobilizada aplicada na hidrólise da lactose é economicamente praticável, apesar do custo da enzima e do processo de imobilização (GIACOMINI et al., 1998).

2.2 – Aspectos de Enzimologia

2.2.1 – Atividade enzimática

As medidas de concentração de soluções, expressas em unidades de massa por unidades de volume, de uso corrente na Química, não têm aplicação para soluções enzimáticas, já que para estas o que importa não é a massa, mas a atividade. Desnaturações parciais podem levar duas soluções de mesma concentração enzimática a ter atividades muito diferentes. A dosagem de enzimas é sempre feita através da medida de sua atividade, que é avaliada pela velocidade da reação que a enzima catalisa. Dada a especificidade das enzimas, essa medida é possível mesmo na presença de outras proteínas. Para efetuar essas dosagens, uma amostra da solução contendo a enzima é incubada com concentrações altas de substratos (para garantir a velocidade máxima e impedir que pequenas variações na concentração do substrato possam afetar as medidas). A velocidade da reação é medida e expressa em Unidades Internacionais. Uma Unidade Internacional (U) é a quantidade de enzima capaz de formar um μmol de produto por minuto em condições ótimas de medida (pH, temperatura, etc.), especificadas para cada caso (BORZANI et al., 2001).

2.2.2 – Influência do meio sobre a atividade enzimática

A estrutura e a forma do sítio ativo são decorrência da estrutura tridimensional da enzima e podem ser afetadas por quaisquer agentes capazes de provocar mudanças conformacionais na estrutura proteica. Isso torna a atividade enzimática dependente do meio ambiente, notadamente do pH e temperatura (BORZANI et al., 2001). O conhecimento da constituição de determinada enzima ou, ao menos, da existência de determinados grupos, radicais ou íons, o que hoje ocorre com a maioria das enzimas classificadas, permite exercer um controle sobre o mecanismo de ativação, desativação e inibição (REGULY, 2000).

2.2.2.1 – Influência do pH sobre a atividade enzimática

A maioria das enzimas apresenta um valor de pH para o qual a sua atividade é máxima – a velocidade da reação diminui à medida que o pH se afasta desse valor ótimo, que é característico para cada enzima, mas, com frequência, está próximo do pH neutro. A influência do pH sobre a catálise enzimática só pode ser compreendida a partir da análise dos grupos dissociáveis presentes nos grupos R dos aminoácidos (BORZANI et al., 2001).

O pH influencia a atividade enzimática interferindo com a estabilidade e com a atividade propriamente dita, pois propicia que os grupamentos do centro ativo fiquem na forma química adequada para interagirem com o substrato. Os efeitos interagem juntos, mas o conhecimento do pH ótimo de atividade de uma enzima é um bom indicador para caracterizá-la frente ao substrato, principalmente se ela pode atuar sobre mais de um substrato. Cada substrato será melhor transformado em diferentes pHs (FURLONG, 2000)

Em resumo, a influência do pH sobre a catálise enzimática é exercida sobre os grupos dissociáveis de vários aminoácidos. Alguns desses grupos podem fazer parte do sítio ativo ou serem importantes na manutenção da estrutura espacial da molécula. A cada valor de pH, alguns desses grupos apresentam-se protonados ou desprotonados. Existe uma concentração hidrogeniônica que propicia um determinado arranjo de grupos protonados e desprotonados que leva a molécula da enzima à conformação ideal para exercer seu papel catalítico. Esse pH ótimo depende, portanto, do número e tipo de grupos ionizáveis que uma enzima apresenta, ou seja, depende

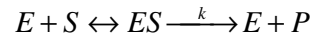
de sua estrutura primária. Quando o substrato contém grupos ionizáveis, as variações de pH também poderão afetar sua carga (BORZANI et al., 2001).

2.2.2.2 – Influência da temperatura sobre a atividade enzimática

A influência da temperatura sobre a cinética da reação enzimática compreende duas fases distintas: em princípio, aumentos de temperatura levam a aumentos de velocidade de reação, por aumentar a energia cinética das moléculas componentes do sistema, aumentando a probabilidade de choques efetivos entre elas. Esse efeito é observado em um intervalo de temperatura compatível com a manutenção da estrutura espacial da enzima. Temperaturas mais altas levam à desnaturação da enzima, ou seja, à perda de sua estrutura nativa, catalítica, por alterarem as ligações químicas que mantêm sua estrutura tridimensional. Rompidas as pontes de hidrogênio, que são ligações bastante termolábeis, desencadeia-se uma cascata de alterações estruturais, levando a enzima a uma nova conformação ou a um estado sem estrutura definida; a enzima é dita, então, desnaturada. A temperatura que provoca desnaturação naturalmente varia para cada enzima, mas, geralmente, está pouco acima de sua temperatura ótima. Os agentes desnaturantes preservam apenas as estruturas covalentes da estrutura proteica, ou seja, as ligações peptídicas (da estrutura primária) e as pontes dissulfeto (da estrutura terciária). Não só as temperaturas elevadas levam à desnaturação. Outras variáveis do meio que afetam as ligações químicas têm o mesmo efeito. Assim, valores extremos de pH, provocando protonação ou desprotonação de grupos, ocasionam perda da atividade da enzima (BORZANI et al., 2001).

As temperaturas altas influenciam principalmente na velocidade da quebra do complexo enzima-substrato, na afinidade da enzima com ativadores e inibidores e na velocidade de destruição da enzima. Quando a temperatura do meio aumenta, a velocidade de destruição da enzima é maior que a da catálise. Este efeito pode ser verificado pela equação de Arrhenius, que relaciona a velocidade de reação e a temperatura absoluta. Para situações práticas pode-se generalizar que a maioria das enzimas apresenta um ótimo de atividade entre 30 e 40 °C. Na faixa entre 45 e 50 °C, as enzimas começam a ser inativadas por desnaturação térmica, que acima de 50 °C é muito rápida (FURLONG, 2000).

Na reação enzimática



a constante de velocidade K , dentro de certos limites, é função crescente da temperatura do sistema.

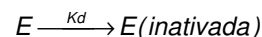
A influência da temperatura na constante de velocidade K obedece à lei de Arrhenius, representada pela Equação 2.1.

$$K = A.e^{-\frac{E_a}{RT}} \quad (2.1)$$

onde A é a constante pré-exponencial, E_a é a energia de ativação, R é a constante dos gases perfeitos e T é a temperatura absoluta do sistema.

Esta equação exponencial pode ser trabalhada sob a forma de logaritmo para que se possa obter uma relação linear entre a temperatura e a velocidade da reação, em que a partir da tangente da reta se pode conhecer a energia de ativação da reação àquela temperatura. Este conhecimento facilitará o cálculo em termos de quantidade de energia para que ocorra uma transformação enzimática que resulte no rendimento desejado de um produto, ou para diminuir ou inibir uma transformação indesejável (FURLONG, 2000).

Devido à termolabilidade das enzimas, ao mesmo tempo em que ocorre a reação enzimática, desenvolve-se também a reação de inativação térmica da enzima que atua no sistema (BORZANI et al., 2001):



A constante de velocidade desta reação (K_d) também é afetada pela temperatura de acordo com a lei de Arrhenius (Equação 2.2):

$$K_d = A.e^{-\frac{E_d}{RT}} \quad (2.2)$$

sendo E_d correspondente à energia de ativação da reação de desnaturação.

Enquanto o valor de E_a se situa no intervalo 6 a 15 kcal.mol⁻¹, o de E_d é consideravelmente maior, atingindo 50 a 150 kcal.mol⁻¹ (FURLONG, 2000).

Tanto o valor de K quanto o de K_d aumentam quando a temperatura passa de 20 a 30°C. Enquanto K (constante de velocidade de formação do produto) se torna aproximadamente 2 vezes maior, K_d (constante de velocidade de inativação térmica da enzima) se torna cerca de 860 vezes maior. Compreende-se, assim, por que motivo a elevação da temperatura acima de certo valor acarretará, devido às altas velocidades de inativação térmica da enzima, diminuição da velocidade de formação do produto (BORZANI et al., 2001).

A temperatura ótima de atividade é uma característica de cada enzima, embora isto não seja um critério absoluto para caracterizar uma enzima, pois não é um parâmetro fixo e pode ser influenciado por variações de outras condições do ambiente, tais como pH e tempo, sendo, portanto, aplicável em determinadas condições (FURLONG, 2000). O incremento na estabilidade térmica pode ser atribuído ao aumento da rigidez da estrutura terciária da proteína (KNEZEVIC et al., 2006).

Um parâmetro imprescindível quando se avalia a estabilidade enzimática é a meia-vida, que corresponde ao intervalo de tempo necessário, a uma dada temperatura, para que a enzima tenha sua atividade reduzida a 50% da atividade inicial.

2.2.2.3 – Termodinâmica da desnaturação enzimática

De acordo com Cornich-Bowden & Cardenas (2004), citados por Oliveira (2007), organismos vivos são sistemas químicos distantes do equilíbrio termodinâmico, e basear-se apenas nos conceitos termodinâmicos para entendê-los nem sempre é aconselhável. A compreensão dos valores da energia livre e da entalpia, por exemplo, pode ter muito a dizer sobre um processo, assim como as constantes cinéticas que são mais comumente analisadas.

A energia livre de Gibbs (ΔG) de uma enzima é diferente para cada estado (forma nativa e desnaturada) e indica quanto da conformação inicial ainda está preservada ou ativa. A desnaturação só ocorre quando ΔG assume valor negativo, indicando que o estado atual apresenta menos energia disponível, devido à desnaturação, quando comparado com o estado inicial (MODELL & REID, 1983). A variação de ΔG de um estado para outro prediz a taxa de reação, por exemplo: o aumento da concentração de substrato ligado aos sítios ativos da enzima diminui a

energia livre do sistema, ou ainda, a desnaturação da enzima diminui a disponibilidade de sítios reativos. Diz-se, portanto, que a energia livre de Gibbs é composta pela energia de ligação e a energia de ativação (BLANCH & CLARK, 1997, citados por OLIVEIRA, 2007).

A entalpia (ΔH) é uma forma de energia chamada de função de estado por depender basicamente do estado em que a variável se encontra e não do caminho percorrido até o estado atual. Por esse motivo, a variação da entalpia de um processo é medida hipoteticamente tomando etapas da reação. Quando a etapa final absorve muito mais energia do que o estado inicial, o valor de ΔH será positivo - o que normalmente acontece em processos de desnaturação enzimática (DORAN, 2002).

A entropia (ΔS) de um sistema aumenta com o aumento da temperatura, indicando que as moléculas estão mais agitadas e que há menos ordem, além de ocorrer a quebra de números consideráveis de ligações fracas como pontes de hidrogênio. Os grupos polares vão perdendo a capacidade de ordenar as moléculas de água e a liberdade dos grupos apolares expostos pelo desdobramento da proteína aumenta o sentido de desordem (MODELL & REID, 1983).

2.2.2.4 – Efeito da concentração de substrato sobre a atividade enzimática

A cinética de grande número de enzimas pode ser predita pelo modelo matemático de Michaelis e Menten, proposto em 1913. Neste modelo encaixam-se as reações onde há saturação a um determinado valor de substrato oferecido, ou seja, não há incremento na velocidade de reação independente do aumento da concentração de substrato. A Equação 2.3, que representa este modelo, descreve o comportamento da velocidade da reação enzimática em relação ao aumento da concentração de substrato, em que V_0 é a velocidade inicial de reação, S_0 é a concentração inicial de substrato, $V_{máx}$ é a velocidade máxima e K_m é a constante de Michaelis-Menten.

$$V_0 = \frac{V_{máx} \cdot [S_0]}{K_m + [S_0]} \quad (2.3)$$

Quando $S_0 \ll K_m$, ou seja, para baixas concentrações de substrato, a equação representa uma condição em que o aumento na concentração de substrato implica num aumento proporcional da velocidade da reação, correspondendo a uma reação de

primeira ordem com respeito ao substrato. Para $S_0 \gg K_m$, a equação reduz-se a $V_0 = V_{m\acute{a}x}$, ou seja, significa que a concentração de substrato não é mais o fator limitante, já que seu aumento não acarreta aumento na velocidade de reação (reação de ordem zero). Quando $S_0 = K_m$, $V_0 = V_{m\acute{a}x}/2$, significando que K_m é igual a concentração de substrato em que a enzima atinge metade de sua velocidade máxima. K_m tem um valor característico para cada reação enzimática, e quanto menores seus valores, maior é a afinidade da enzima pelo substrato (FURLONG, 2000).

Lineweaver e Burk, em 1934, propuseram um método gráfico linearizando a equação de Michaelis e Menten, consistindo em inverter os componentes da equação inicial, conforme Equação 2.4, permitindo os cálculos dos parâmetros K_m e $V_{m\acute{a}x}$ pelos coeficientes angular e linear da reta.

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}} \times \frac{1}{S_0} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} \quad (2.4)$$

Quando se processa uma reação enzimática à temperatura ótima, pH ótimo, concentração de substrato constante e os demais fatores adequados, observa-se que inicialmente ocorre uma relação linear entre a velocidade da reação e o aumento da concentração da enzima. Numa segunda etapa observa-se uma estabilização na velocidade de reação, indicando que a concentração da enzima não é mais um fator limitante, mas sim a concentração do substrato. Então, para encontrar a atividade máxima da enzima, é necessário balancear a relação concentração de enzima e concentração de substrato (FURLONG, 2000).

2.3 – Imobilização de Enzimas

2.3.1 – Considerações gerais

Considerando uma célula intacta qualquer, verifica-se que existem centenas de macromoléculas (ácidos nucléicos, proteínas, polissacarídeos, lipoproteínas, dentre outras) dispostas dentro de um volume extremamente pequeno, o que necessariamente deve provocar um forte inter-relacionamento entre elas. Dentre as mais de 2000 enzimas conhecidas, a maioria delas encontra-se associada a membranas. Por conseguinte, as enzimas em seu meio natural agem como típicos catalisadores heterogêneos, isto é, encontram-se insolubilizadas. Já em 1916, Nelson

e Griffin demonstraram a viabilidade de se adsorver a invertase em carvão ativo, sem perda apreciável da atividade enzimática inicial. Contudo, foi a partir dos anos 60 que as pesquisas se intensificaram no sentido de estabelecer métodos eficientes para ligar enzimas, quer por meios físicos quer químicos, a suportes inertes insolúveis. Deve-se a Katchalski a introdução dos primeiros suportes úteis na preparação das enzimas imobilizadas (LIMA et al., 2001).

Imobilização é uma técnica que confina uma enzima com atividade catalítica de interesse em um sistema, prevenindo assim sua migração para o meio onde se encontram o substrato e o produto, de forma que a enzima encontre-se física ou quimicamente associada a um suporte ou a uma matriz. As enzimas em solução se comportam como outro soluto qualquer, tendo total liberdade de movimento, mas quando imobilizadas sua liberdade é altamente restringida (BICKERSTAFF, 1997). As enzimas imobilizadas podem ser usadas de forma repetida e contínua (GROSOVÁ et al., 2007)

Algumas propriedades particulares das enzimas, tais como sua não reutilização, alta sensibilidade a diversos agentes desnaturantes e presença de adversos efeitos sensoriais e tecnológicos podem dificultar o efetivo uso das enzimas (NIJPELS, 1981; GEKAS et al., 1985, citados por HAIDER & HUSAIN, 2007). Muitas dessas limitações indesejáveis podem ser superadas pelo uso de enzimas imobilizadas. Enzimas imobilizadas têm demonstrado serem mais vantajosas para catálises do que enzimas livres (HUSAIN et al., 1985; SALEEMUDDIN & HUSAIN, 1991; AKHTAR et al., 2005, citados por HAIDER & HUSAIN, 2007).

A utilização de enzimas imobilizadas como catalisadores de processo vem justamente tentar reduzir ou até mesmo eliminar os entraves que limitam o emprego de enzimas solúveis em aplicações industriais, tais como instabilidade operacional, custos e dificuldade de recuperação para a reutilização após o término do processo catalítico (REGULY, 2000).

As enzimas estão sujeitas à inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos, podendo esta ocorrer quando estocadas ou durante o uso. Para que a catálise seja eficiente em um determinado processo, há a necessidade de protegê-las da interação com o solvente, meio no qual é realizada a reação, pois o mesmo poderia provocar a inativação, impossibilitando a catálise da reação. Frente a este problema, novas técnicas de imobilização têm sido desenvolvidas para fornecer a estabilidade das enzimas e facilitar sua recuperação e reutilização (DALLA-VECCHIA et al., 2004).

Outro fator relevante para a utilização de enzimas imobilizadas é que se estabelece um maior controle sobre o processo, pois se torna possível parar a reação quando necessário, alterando algum parâmetro de reação ou fechando-se a vazão do biorreator. O emprego de enzima livre acarreta a inevitável presença do biocatalisador como parte integrante do meio, caso não houver uma etapa de separação da enzima (SANGEETHA et al., 2005).

A imobilização de enzimas oferece inúmeras vantagens sobre as enzimas solúveis. A imobilização permite o reuso das enzimas e pode fornecer um melhor ambiente para a atividade catalítica. O uso de β -galactosidase imobilizada na produção de leite com baixo teor de lactose tem sido descrita por vários autores (BAKKEN et al., 1989 ; ZHOU et al., 2003; LADERO et al., 2005, citados por HAIDER & HUSAIN, 2007).

O uso de enzimas solúveis tem diversas desvantagens, tais como instabilidade e sensibilidade às condições de processo, exceto naquelas ótimas. Por essas razões, a aplicação de biocatalisadores em fase sólida tem sido cada vez mais importante. As vantagens das enzimas imobilizadas são que os biocatalisadores geralmente podem ser usados repetidamente em sucessivas bateladas, ou o processo pode eventualmente ser levado em um reator operando continuamente (BIRÓ et al., 2008).

As indústrias requerem enzimas que tenham altas produtividade e estabilidade para usos repetidos e por período extenso. A imobilização enzimática apresenta muitas vantagens importantes se comparada ao uso de enzimas solúveis: reutilização, operação contínua, formação de produto controlada, e processamento simplificado e eficiente (TURECEK et al., 1990, citados por MARIOTTI et al., 2008). Reactores contínuos fornecem altas produtividades e minimizam o tempo de *downstream*, custo da enzima e o capital de investimento (ABRAHAM et al., 2004, citados por MARIOTTI et al., 2008), e oferece um *design* atrativo para os reatores de enzimas (ROY & GUPTA, 2003).

Várias técnicas e suportes estão sendo avaliados para a imobilização de importantes enzimas industriais. Enzimas têm sido imobilizadas em suportes por absorção física, ligação covalente, entrelaçamento ou *cross-linking*. Imobilização é uma ferramenta atrativa com vantagens potenciais, incluindo aumento da estabilidade comparada à enzima solúvel, melhor controle de operação, facilidade de separação dos produtos de reação, evitando contaminação do produto com o biocatalisador e flexibilidade do *design* do reator. Assim, a imobilização torna possível o eficiente uso

de uma enzima em uma aplicação industrial (GREENBERG & MAHONEY, 1981; GEKAS & LOPEZ-LEIVA, 1985, citados por NAKKHARAT & HALTRICH, 2007).

O método a ser usado depende fundamentalmente do objetivo, ou seja, do processo catalítico no qual a enzima vai ser usada, porque fatores como natureza dos reagentes, solubilidade, compatibilidade com o suporte, matriz ou cápsula, etc., além do custo, ditam a aplicabilidade deste ou daquele método (REGULY, 2000).

2.3.2 – Métodos de imobilização

Existem dois tipos de suportes para a imobilização de enzimas, os que as aprisionam fisicamente e os que as aderem à superfície. No primeiro caso, são encapsulados em glóbulos ou fibras feitas de polissacarídeos, de proteínas ou de polímeros sintéticos. No segundo, as enzimas são fixadas ao suporte de imobilização diretamente por ligações químicas (iônicas ou covalentes) (MEERSMAN, 1992).

Muitos métodos diferentes de imobilização têm sido desenvolvidos, incluindo entrelaçamento em alginato de cálcio e em fibra de acetato de celulose, ligação covalente em quitosana, espuma de poliuretano, gelatina e pó de ossos (D' SOUZA, 2002, citado por NAGANAGOUDA & MULIMANI, 2006). Alguns desses métodos resultam em baixos rendimentos de imobilização ou contínuas perdas de enzimas (NAGANAGOUDA & MULIMANI, 2006).

Em princípio os métodos de imobilização podem ser classificados em alguns tipos básicos, com o mesmo propósito de reter altas concentrações de enzimas, divididos em retenção física, união química e métodos combinados (ALVES, 2008):

2.3.2.1 – Retenção física

Encapsulamento

A enzima é imobilizada no interior de esferas, cujo envoltório é constituído por um polímero geleiforme e semipermeável. O procedimento clássico consiste em se dissolver a enzima em uma solução aquosa de alginato de sódio, que é gotejada sobre uma solução aquosa contendo íons bivalentes (Ca^{2+} , por exemplo). Tão logo a gota de alginato de sódio entra em contato com a solução salina, forma-se uma esfera, dentro da qual as moléculas de enzima ficam retidas, cuja membrana é constituída pelo

polímero de alginato de cálcio (VITOLLO & CARREIRA, 1992, citados por LIMA et al., 2001).

A imobilização por encapsulação pode ocorrer através da separação por membranas, na qual a enzima encontra-se fisicamente separada do meio de reação, através de uma película (membrana) semipermeável ou em membranas fibrosas semipermeáveis, que consiste no confinamento da enzima numa dada região da solução, através de uma membrana semipermeável. A separação por membranas acarreta em limitações difusionais intensas (BARON, 2008).

Entrelaçamento em polímero ou matriz

As enzimas são aprisionadas entre as malhas de um polímero geleiforme. A eficiência do entrelaçamento, a permeabilidade do gel e sua resistência mecânica dependerão da composição dos reagentes e da natureza do monômero utilizado (FORESTI & FERREIRA, 2007, citados por BARON, 2008).

2.3.2.2 – União química

Adsorção

Este método consiste na adsorção da enzima em um suporte inerte, através de ligações eletrostáticas ou hidrofóbicas, tais como interações iônicas, “forças de van der waals”, ligações de hidrogênio e interações dipolo-dipolo. Este tipo de imobilização causa uma pequena modificação na estrutura nativa da enzima, se comparado aos outros tipos de imobilização, e, por isso, geralmente não promove perda da atividade catalítica (VINU et al., 2005).

Formação de ligações covalentes

A união covalente de uma enzima a um suporte é talvez o método de imobilização mais interessante do ponto de vista industrial. Este método confere maior resistência à desnaturação pela temperatura, por solventes orgânicos ou pH, pois aumenta a estabilidade da estrutura terciária da enzima (ARROYO, 1998). É o mais usado para a imobilização da enzima β -galactosidase. As enzimas são covalentemente ligadas ao suporte através dos grupos funcionais que não são

essenciais a sua atividade catalítica. Comparado aos outros métodos tem as seguintes vantagens: as enzimas não se separam do suporte, o biocatalisador pode interagir facilmente com o substrato, desde que esteja na superfície do suporte. Por outro lado, as principais desvantagens são o alto custo e baixo rendimento devido à exposição do biocatalisador a reagentes tóxicos ou condições severas de reação (GROSOVÁ et al., 2007). Em geral, as reações são feitas em meio aquoso, à temperatura entre 0°C e 25°C e o pH próximo à neutralidade. A escolha das condições irá depender da estabilidade da enzima e do suporte frente ao pH de formação das ligações covalentes, assim como da estabilidade das ligações suporte-enzima frente ao pH de utilização do sistema imobilizado (LIMA et al., 2001).

Cross-linking

Também denominada reticulação ou entrecruzamento, é uma técnica utilizada amplamente na estabilização de muitas enzimas. A reticulação consiste no uso de reativos bifuncionais que originam uniões intermoleculares entre as moléculas de enzima, resultando em ligações irreversíveis, capazes de resistir a condições extremas de pH e temperatura (ARROYO, 1998).

2.3.2.3 – Métodos combinados

No caso de um único método ainda não apresentar estabilidade suficiente, pode-se aplicar métodos em sequência como *cross-linking* da enzima seguido da imobilização ou o *cross-linking* da enzima já imobilizada. Esta prática é indicada pois evita a perda de propriedades mecânicas além de produzirem compostos estáveis a extremos de pH e temperatura (OLIVEIRA, 2007).

2.3.3 – Tipos de suportes para imobilização de enzimas

Embora se apliquem diversas técnicas de imobilização a inúmeras enzimas, não existe um método universal válido para todas as enzimas em todos os casos (ARROYO, 1998). Na literatura existem inúmeros materiais inertes que podem ser usados para imobilizar enzimas. A natureza física desses suportes pode variar, desde materiais geleiformes (alginato, álcool polivinílico, carragena) até superfícies sólidas (lâminas de aço, pérolas de vidro poroso, Eupergit[®] C), recobertas com alguma

substância capaz de interagir com a enzima (CANILHA et al., 2006). Na Tabela 1.1 são apresentados alguns exemplos de materiais usados como suportes.

Tabela 1.1 – Classificação de suportes inertes.

Tipo de suporte	Materiais	Porosidade	Estabilidade
Não poroso	Vidro, sílica, aço	-	Alta
Microencapsulado	Triacetato de celulose	35 Å	Moderada
Entrelaçado	Poliacrilamida, PVP	Variada	Baixa
Macroporoso	Alumina, sílica	200-1000 Å	Alta

Fonte: LIMA et al. (2001).

Enzimas podem ser imobilizadas em vários suportes e por diferentes métodos. Para propósitos práticos, suportes com partículas de tamanho na faixa de milímetros são usados, principalmente. Entretanto, mais e mais estudos são relatados para a imobilização de enzimas em micropartículas com grande superfície específica e numerosos sítios ativos para as moléculas de enzimas serem fixadas (GUO et al., 2003; BUDRIENE et al., 2005, citados por BIRÓ et al., 2008). Além do mais, por causa do tamanho muito pequeno das partículas do suporte, o impedimento à difusão interna diminui (BIRÓ et al., 2008).

De acordo com Bickerstaff (1997), a escolha do suporte para a imobilização deve considerar as seguintes características: estabilidade frente aos parâmetros de processo e ataque microbiano; funcionalidade química; durabilidade e capacidade de reutilização; compatibilidade aceitável com a enzima e substrato; custo e facilidade de manuseio.

A escolha do método de imobilização e do tipo de suporte dependerá, essencialmente, de dois fatores: das características peculiares da enzima e das condições de uso da enzima imobilizada. Geralmente as condições de imobilização para uma dada enzima só poderão ser estabelecidas empiricamente. O procedimento consiste em se imobilizar a enzima em vários suportes por meio de diferentes métodos, avaliando-se, a seguir, a atividade do sistema imobilizado. Logicamente o binômio suporte-método mais adequado será aquele que propiciar maior atividade após a imobilização (LIMA et al., 2001).

2.3.3.1 – Imobilização utilizando Alginato de Cálcio como suporte

O alginato é extraído de algas marrons como *Laminaria digitata* e *Macrocystis pyrifera*. É um polissacarídeo altamente degradável quando aquecido por tempo prolongado. Sua viscosidade aumenta em pH abaixo de 4,0 e, também, pela presença de íons Ca^{2+} , com os quais pode formar géis (HEO et al., 2000). Em termos moleculares, o alginato é um polissacarídeo linear composto de dois blocos principais formados por unidades de ácido manurônico (M) e ácido gulurônico (G), unidos por ligações 1,4, podendo variar em composição e seqüência, dependendo da alga de origem (Figura 2.1) (JUNIOR, 2006).

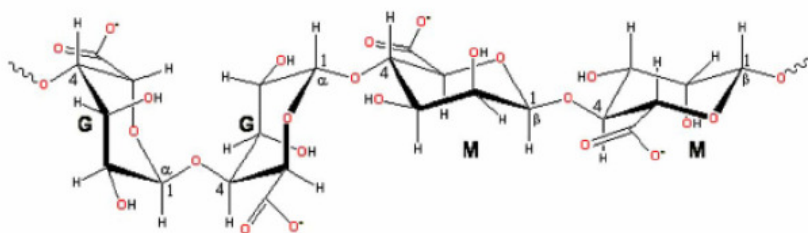


Figura 2.1 – Estrutura molecular do polissacarídeo alginato.

O entrelaçamento em alginato de cálcio é um método rápido, atóxico, de fácil reprodutibilidade e de baixo custo. Na presença de cátions monovalentes o alginato forma sais em água, mas na presença de cátions polivalentes como Ca^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} é formado um polímero inerte através de reação de troca iônica, formando uma malha polimérica com o biocatalisador no interior dos espaços vazios, propriedade esta usada para a inclusão de enzimas na matriz do alginato (STAMATIS et al., 2006).

Vantagens como baixo custo, grande disponibilidade no mercado, possibilidade de ampliação da escala de produção e a aceitação das substâncias utilizadas para a imobilização (alginato e cloreto de cálcio) como aditivos na produção de alimentos têm sido citadas na literatura (CORCORAN, 1985). Entre as desvantagens do uso desse polímero como suporte destacam-se a instabilidade estrutural na presença de agentes quelantes do íon cálcio (como fosfato, lactato e citrato), a tendência das esferas em sofrer dilatação na presença de cátions monovalentes e as limitações impostas à transferência de substratos e produtos (FREEMAN & LILLY, 1998).

2.3.3.2 – Imobilização utilizando Eupergit® C como suporte

Eupergit® C é um suporte que consiste em microesferas macroporosas, desenvolvido através da copolimerização de N, N' - metileno-bis-metacrilamida, glicidil-metacrilato, alil-glicidil-éter e metacrilamida. Este suporte é quimicamente estável em qualquer valor de pH, podendo imobilizar uma enzima na faixa de pH na qual ela é estável e não perde sua atividade catalítica. Eupergit® C também é mecanicamente estável, uma vez que não apresentou nenhum desgaste após 650 ciclos de operação em reatores de mistura com volumes de substrato de até 1000L (KATCHALSKI-KATZIR & KRAEMER, 2000).

Este suporte já foi avaliado para a imobilização de várias enzimas: β -galactosidase de *Bacillus circulans*, α -galactosidase de *Aspergillus oryzae*, para transformar lactose em glicose e galactose, ou produzir galactooligossacarídeos (HERNAIZ & CROUT, 2000).

Eupergit® C liga proteínas via seus grupos oxiranos que reagem a pHs neutro e alcalino com os grupos amino da molécula de uma enzima para formar ligações covalentes que são termicamente estáveis dentro de uma faixa de pH de 1,0 a 12 (Figura 2.2). Eupergit® C pode também ligar moléculas de enzima via seus grupos sulfidril e carboxila em uma faixa de pH ácido, neutro e alcalino (ALTPEKIN et al., 2010).

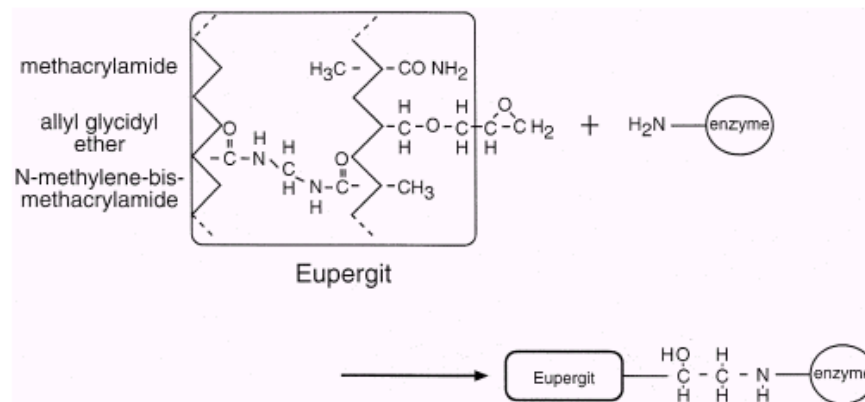


Figura 2.2 – Estrutura da Eupergit® C e a imobilização covalente de uma enzima.

Devido à alta densidade dos grupos oxiranos na superfície das esferas ($600 \mu\text{mol/g}_{\text{seca}}$ Eupergit[®] C), enzimas são imobilizadas em vários locais de sua estrutura. Este fenômeno é chamado ligação multipontual, que é considerado o principal fator para a alta estabilidade operacional de enzimas ligadas em Eupergit[®] C. O procedimento de imobilização de enzimas em Eupergit[®] C é simples: a enzima é dissolvida em tampão, misturada com Eupergit[®] C e mantida a 20-25°C por 24 a 100 h. A enzima imobilizada é então lavada com água e tampão para ser usada em sua aplicação subsequente. A capacidade de ligação de uma enzima é em torno de $100 \text{mg}_{\text{proteína/g}_{\text{Eupergit}^{\text{®}} \text{ C}}}$ (peso seco). Eupergit[®] C é comercialmente disponível em todo mundo, e quantidades tão grandes (diversas toneladas por ano) têm sido empregadas por companhias para a produção de biocatalisadores. Tem, entretanto, também se tornado padrão para imobilização covalente de enzimas (KATCHALSKI-KATZIR & KRAEMER, 2000).

2.3.3.3 – Imobilização utilizando Quitosana como suporte

Quitosana é um polissacarídeo formado principalmente por unidades de 2-amino-2-deoxi-D-glicose, que estão ligadas por ligações β -1,4. Ela é obtida por deacetilação com um tratamento alcalino drástico de quitina, que é o principal componente do exoesqueleto de crustáceos e insetos e também nas paredes celulares de alguns fungos. Quitosana tem sido usada como suporte na imobilização de microrganismos e enzimas, tais como α -quimotripsina e fosfatase ácida (MUZZARELLI, 1976, citado por CARRARA & RUBIOLO, 1994), β -glicosidase de *Aspergillus* (BISSET, 1978, citado por CARRARA & RUBIOLO, 1994), fosfatase alcalina e pepsina (HIRANO, 1979, citado por CARRARA & RUBIOLO, 1994) e penicilina G-acilase (BRAUN, 1989, citado por CARRARA & RUBIOLO, 1994). O custo desse material com relação a outros usados como suporte é baixo. A quitosana (Figura 2.3) é um heteropolissacarídeo derivado da N-desacetilação da quitina (CHATTERJEE et al., 2005). Quitina e quitosana têm numerosas aplicações, como a purificação de água e bebidas (KNORR, 1991, citado por CARRARA & RUBIOLO, 1994), e, devido às suas propriedades antimicrobianas, são usadas para promover a redução no crescimento microbiano (POPPER, 1990, citado por CARRARA & RUBIOLO, 1994) e como material de revestimento preservativo (GAOUTH, 1991, citado por CARRARA & RUBIOLO, 1994).

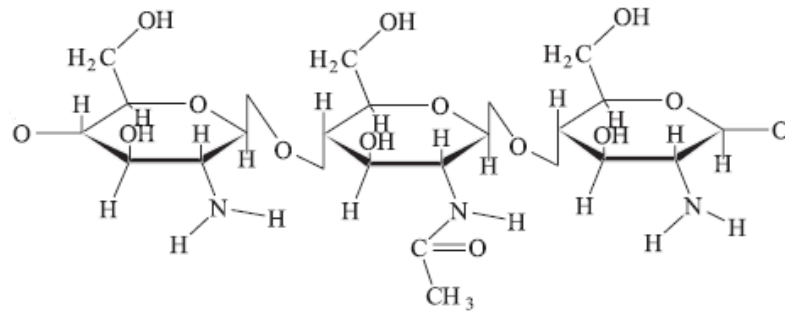


Figura 2.3 – Estrutura química do polissacarídeo quitosana.

A quitosana é um material não-tóxico, biocompatível e biodegradável (CHEN et al., 2006; KUMAR, 2000, citados por BIRÓ et al., 2008). Diferentes tamanhos de quitosana nas partículas do suporte podem ser formadas por diversos métodos, tais como precipitação, emulsão *cross-linking*, *spray drying* (HE et al., 1999; FILIPOVIC-GREIC et al., 2003, citados por BIRÓ et al., 2008), gotículas de emulsão coalescente e método de micelas reversas (AGNIHOTRI et al., 2004, citados por BIRÓ et al., 2008). Seus grupos amino e hidroxila - após modificações químicas - possibilitam o acoplamento de enzimas (KRAJEWSKA, 2004, citado por BIRÓ et al., 2008). Desta forma, a quitosana é frequentemente usada com material de suporte para imobilização de enzimas (SPAGNA et al., 1998; PORTACCIO et al., 1998; SPAGNA et al., 2002, citados por BIRÓ et al., 2008).

Uma das mais recentes linhas de pesquisa sobre quitosana diz respeito ao desenvolvimento de suportes para imobilização de células, fármacos e biomoléculas. Neste contexto, o polímero é utilizado como matéria-prima no desenvolvimento de membranas, filtros e microesferas (*beads*), os quais podem ser utilizados em diversos ramos da biotecnologia (GUIBAL et al., 2005).

Suportes baseados em polímeros naturais, tais como celulose, dextrana, amido, quitina, quitosana ou agarose podem ser alternativas úteis aos suportes inorgânicos para a técnica de imobilização, por causa da possibilidade de fazer ligações covalentes e também das dimensões bem definidas de seus poros (KRAJEWSKA, 2004).

A imobilização enzimática em quitosana pode principalmente ser alcançada por meio da reação do glutaraldeído entre os grupos amino livres da quitosana e as moléculas da enzima para formar ligações covalentes (BOOKLET OF IBFLKB, 1983; BRAUN, 1989, citados por CARRARA & RUBIOLO, 1994). Este biopolímero solúvel,

em pH 5,5, pode formar géis por ação de um polícatión com trifosfato de sódio pela oposição da carga eletrolítica (KNORR, 1985, citado por CARRARA & RUBIOLO, 1994), que permite obter matrizes em diferentes configurações e tamanhos.

2.4 – Reator de Leito Fixo para Imobilização de Enzimas

Embora diversas configurações de reatores tenham sido relatadas para a imobilização de enzimas, o reator de leito fixo é geralmente selecionado para aplicações industriais ou comerciais por causa de sua alta eficiência, facilidade de operação e simplicidade geral. Este tipo de reator mostra aumento de eficiência devido a sua mais alta concentração de enzima por unidade de volume, e seu pequeno volume livre. Ele é também mais apropriado que um reator de mistura quando a enzima selecionada está sujeita à inibição (LILLY & DUNNIL, 1976, citados por NAKKHARAT & HALTRICH, 2007).

2.5 – Efeitos Causados pela Imobilização Enzimática

O suporte e a enzima não são superfícies complementares e, logo após a primeira ligação entre eles, a enzima perde flexibilidade. Quando a enzima está em solução ela se comporta como qualquer outra molécula dispersa no meio e tem total liberdade de movimento e acesso ao substrato, o que não é possível quando esta enzima está imobilizada em um suporte físico (BICKERSTAFF, 1997).

Geralmente, as enzimas imobilizadas são mais estáveis a mudanças de pH e temperatura do que as mesmas enzimas sob a forma solúvel. Mesmo quando suspensas em água, estas enzimas insolubilizadas por imobilização, permanecem estáveis e ativas por meses, de onde advém a possibilidade de seu reuso. A separação dos produtos e reagentes também é mais fácil, pois basta lavagem do catalisador. Pela imobilização, uma enzima se encontra em um microambiente, o qual pode ser muito distinto do existente quando livre em solução, devido à natureza físico-química do suporte. Assim, por exemplo, o pH ótimo poderá ser outro. Como é o caso da quimiotripsina imobilizada por adsorção em caolinito, de alta carga; a enzima tem o seu pH ótimo duas unidades acima do pH ótimo da enzima livre. O mesmo se dá com a fosfatase, cujo pH é mais elevado quando imobilizada (REGULY, 2000).

Ao se agregar uma enzima a um material inerte, por mais suave que seja o procedimento, é razoável esperar algum tipo de efeito sobre sua atividade catalítica, a

qual está intimamente relacionada com a estrutura da macromolécula. Dentre os vários efeitos que a imobilização pode causar salientam-se (LIMA et al., 2001):

Efeitos estéricos

Quando a enzima é ligada ao suporte, ela pode sofrer alguma mudança na conformação, o que poderá abalar sua eficiência catalítica. Além disso, como o processo de interação enzima-suporte é quase sempre aleatório, poderá suceder que a região do sítio ativo se torne menos acessível ao substrato (impedimento estérico), o que acarreta, também, uma queda na atividade. Esses efeitos são de difícil quantificação, e para minimizá-los o único modo é o de padronizar o melhor possível os procedimentos de imobilização (LIMA et al., 2001).

Efeitos do microambiente

Quando a molécula enzimática é ligada a um suporte sólido inerte, ela vai ficar sujeita a uma circunvizinhança algo diferente do que quando se acha livre. Esse fato poderá se refletir sobre os valores dos parâmetros cinéticos. Os efeitos da circunvizinhança, que dependem da natureza física e química do suporte, podem acarretar uma distribuição desigual do substrato, produto e cofatores entre a região vizinha ao sistema imobilizado e o resto da solução. Um exemplo dessa influência é o caso das interações eletrostáticas e/ou hidrofóbicas entre o suporte e as espécies químicas de baixo peso molecular, o que torna os parâmetros cinéticos dependentes da concentração das mesmas. O comportamento cinético de uma enzima presa a um suporte carregado pode diferir daquele apresentado pela enzima livre, mesmo que os efeitos difusionais estejam ausentes. Esse comportamento pode ser atribuído ao fato de que a concentração de espécies químicas carregadas (substratos, íons, produto, etc.) nas proximidades da enzima imobilizada é diferente daquela do resto da solução, devido às interações eletrostáticas daqueles elementos com as cargas do suporte (LIMA et al., 2001).

Efeitos difusionais

Quando a enzima é imobilizada sobre ou dentro de um suporte sólido, o substrato deve se difundir do seio da solução até o sítio ativo da enzima. Assim,

quando a velocidade de difusão do substrato é menor do que a velocidade de transformação pela enzima, a velocidade observada é mais baixa do que a esperada para uma dada concentração de enzima em solução, visto que nem todas as moléculas de enzima estarão em contato com o substrato, isto é, não se atinge a saturação. Existem dois tipos de resistências difusionais: resistências difusionais externas e efeitos difusionais internos (LIMA et al., 2001).

Verifica-se que os fatores que influem na estabilidade e, com isso, na atividade, são múltiplos. Pelo que os resultados publicados, da avaliação da estabilidade térmica de enzimas imobilizadas, são variados e muitas vezes contraditórios, havendo citações tanto de aumento da estabilidade com a imobilização, como de diminuição. A maior vantagem do uso de enzimas e células imobilizadas em relação às mesmas enzimas em estado livre, em solução, é o alargamento do período de manutenção da atividade catalítica, motivo, aliás, do interesse na imobilização (REGULY, 2000). Demonstrou-se que, nos casos onde o uso de enzima imobilizada foi possível, os custos de processo diminuiram em pelo menos 50% (LIMA et al., 2001).

Não se justifica o reuso de uma enzima, através da imobilização onde não há bom aumento da estabilidade. Devem ser levados em conta e convenientemente balanceados os custos da enzima livre, em bruto ou isolada, os custos da imobilização, a produtividade do processo catalítico (g de produto/h, unidade de atividade enzimática) para decidir sobre a conveniência, tanto do isolamento, quanto da imobilização da enzima (REGULY, 2000).

2.6 – Imobilização de β -galactosidase

Albayrak & Yang (2002) estudaram a imobilização de β -galactosidase produzida por *Aspergillus oryzae* em fibras de algodão. A condição ótima para a ativação e o mecanismo da imobilização da enzima foram investigados, sendo que a máxima atividade da enzima foi obtida em pH 4,5. A enzima imobilizada foi caracterizada quanto à sua estabilidade térmica, não havendo alteração da atividade durante 15 dias, a 40 °C.

Ladero et al. (2000) estudaram a imobilização da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* em sílica-alumina. Quanto aos resultados obtidos nesse estudo, a máxima temperatura a ser empregada para a hidrólise da lactose com a enzima imobilizada foi 40 °C. A atividade da enzima após a imobilização foi, em todos os casos

estudados, igual ou maior que 50% da atividade da enzima livre. Verificaram também que a imobilização em sílica-alumina não alterou o pH ótimo da enzima.

β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* foi imobilizada em fibras compostas de alginato e gelatina, reticuladas com glutaraldeído. Essa imobilização resultou em 56% da atividade relativa retida por 35 dias, sem queda. As condições ótimas não foram afetadas pela imobilização, e o pH ótimo e a temperatura para a enzima livre e imobilizada foram, respectivamente, iguais a 4,5 e 50°C, para ambas as formas da enzima. A enzima imobilizada foi mais estável a altos pH e temperatura. Os parâmetros de cinética para a β -galactosidase solúvel e imobilizada foram também determinados, sendo os valores calculados de K_m para as enzimas livre e imobilizada iguais a 42 e 51 mM, respectivamente (TANRISEVEN & DOGAN, 2002).

Serio et al. (2003) estudaram o comportamento de β -galactosidase imobilizada com ligação covalente em diferentes óxidos, tais como alumina, sílica e alumina silicada. Foi observada uma forte dependência das atividades da enzima imobilizada em ambas naturezas química e física dos suportes. Houve um baixo rendimento (não excedendo 5%) na retenção da atividade enzimática, explicada pelo bloqueio dos poros do suporte com as moléculas de enzima antes da adição do glutaraldeído.

Lactozym[®] foi imobilizada em esferas de celulose via ligação química com epícloridrina. Foi observada recuperação da atividade maior que 90%, medida pela hidrólise da lactose. A enzima imobilizada pode ser reutilizada três vezes sem qualquer mudança na performance do reator de leite fluidizado. A hidrólise da lactose de soro pela enzima imobilizada foi testada em modo contínuo a 30°C. O leite fluidizado pode também hidrolisar lactose de leite (60%) dentro de 5 h. Os dados mostraram que esta enzima, a partir de uma fonte de *status* GRAS, pode também ser usada para desenvolver um processo para a hidrólise da lactose de soro como também na produção de leite com baixo teor de lactose. A preparação otimizada foi caracterizada em termos de seus parâmetros cinéticos. O parâmetro cinético K_m da enzima livre sofreu alteração de 1,7 para 2,3 mM na imobilização em polímero solúvel. O valor de $V_{m\acute{a}x}$ da enzima imobilizada mostrou uma queda desprezível para 63,7 mmol.min⁻¹ (contra 77,5 mmol.min⁻¹ para a enzima livre) (ROY & GUPTA, 2003).

Zhou & Chen (2001) estudaram a imobilização de β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* em superfície de grafite usando glutaraldeído como reagente de *cross-linking* com um rendimento na atividade específica de 17% e 25%, enquanto a capacidade da enzima foi 1,8 e 1,1 U.cm⁻² da área da superfície externa do grafite, respectivamente. Os parâmetros K_m e $V_{m\acute{a}x}$ para a enzima livre foram estimadas em

1,74 mM e 77,34 $\mu\text{mol o-nitrofenol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}_{\text{enzima}}^{-1}$, respectivamente. A hidrólise da lactose a concentrações de 5% (p/v) da enzima imobilizada também foi investigada. O grau de hidrólise da lactose foi de aproximadamente 70%, a 37°C, em um período de 3 h. A enzima imobilizada apresentou uma boa conservação e estabilidade operacional.

β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* foi fisicamente reticulada em gelatina misturada a fibras de alginato hidrogel, endurecido com glutaraldeído. O rendimento da imobilização foi de 71,75%. As condições ótimas não foram afetadas pela imobilização, e o pH e temperatura para as enzimas livre e imobilizada foram de 4,8 e 50°C, respectivamente. A enzima imobilizada foi mais estável a altos pH e temperatura. Para melhorar o sistema de imobilização, polióis, como o glicerol, foram usados com diferentes quantidades de alginato e gelatina. A atividade da enzima β -galactosidase livre diminuiu rapidamente e o tempo de meia-vida foi em torno de 5 dias a 4°C. A enzima imobilizada continuou muito ativa por um longo período de tempo e esta enzima perdeu cerca de 70% de sua atividade original em um período de 60 dias, conservada a 4°C. O estudo revelou que β -galactosidase entrelaçada em fibras de alginato e gelatina mostrou alto rendimento de imobilização e grande estabilidade na conservação. Imobilização de enzimas em gelatina requer processo adicional e o procedimento envolve congelamento e descongelamento, o que desnatura a enzima e diminui a eficiência da imobilização (NAGANAGOUDA & MULIMANI, 2006).

Dwevedi & Kayastha (2009) otimizaram a imobilização de β -galactosidase de *Pisum sativum* dentro de duas matrizes: Sephadex G-75 e esferas de quitosana. A eficiência da imobilização foi de 75,66% e 75,19% alcançadas com Sephadex G-75 e quitosana, respectivamente. Quitosana-PsBGAL foi melhor apropriada para aplicação industrial baseada em seu amplo pH de aplicação e temperatura ótima, alta estabilidade térmica, reutilização, etc. Sephadex-PsBGAL e Quitosana-PsBGAL mostraram muita variação em suas propriedades catalíticas com respeito à enzima solúvel. Cerca de 50% de perdas na atividade de Sephadex-PsBGAL e Quitosana-PsBGAL foram observados após 12 e 46 dias, a 4°C, respectivamente. Quitosana-PsBGAL mostrou maior taxa de hidrólise da lactose presente no leite e soro à temperatura ambiente e a 4°C que Sephadex-PsBGAL. Em ambos os casos, a lactose de soro de leite foi hidrolisada a maiores taxas que a de leite.

Diferentes preparações de β -galactosidase de *Escherichia coli* foram obtidas por uso de diferentes suportes e estratégias de imobilização (ligação de glioxil, epoxi, ou grupos BrCN ou por *cross-linking* por glutaraldeído em matrizes contendo grupos amino primários). Em todos os casos, a recuperação das atividades ficou entre 50% e

quase 100% (utilizando ONPG como substrato). A imobilização alterou a especificidade da enzima. A enzima imobilizada em Eupergit® 250L diminuiu sua atividade para 70% na hidrólise de ONPG (PESELA et al., 2007).

Bisset & Sternberg (1978) descreveram a imobilização de β -galactosidase em quitosana por glutaraldeído e compararam algumas das propriedades da enzima livre e imobilizada. O pH ótimo para ambas as enzimas foi aproximadamente igual a 4,5. Entretanto, a enzima imobilizada mostrou maior atividade a baixo pH. Este efeito pode ser causado pelo microambiente da matriz da quitosana. Para intervalos de 30 min de ensaio, a temperatura ótima foi de 15 a 20°C maior para a enzima imobilizada. Acima de 75°C a atividade da enzima imobilizada caiu devido à desnaturação da enzima. A forma livre da β -galactosidase foi estável a 50°C por 40 dias, e, mesmo após 67 dias, 85% da atividade original estava ainda retida. A 65 e 70°C a enzima livre foi rapidamente inativada; considerando essas temperaturas, a enzima imobilizada estava relativamente estável.

CAPÍTULO III
MATERIAL E MÉTODOS

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Material

3.1.1 – Enzima

A enzima utilizada foi a β -galactosidase comercial de *Kluyveromyces lactis* Lactozym[®], cedida pela Novozymes (Dinamarca).

3.1.2 – Suportes

Foram utilizados nos experimentos de imobilização enzimática os suportes Eupergit[®] C, Quitosana e Alginato, adquiridos de Sigma Co. (St. Louis, EUA).

3.1.3 – Reagentes

Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico, adquiridos de Merck Co. (Darmstadt, Alemanha) e Vetec (Brasil).

3.2 – Métodos

3.2.1 – Testes preliminares de imobilização

3.2.1.1 – Imobilização utilizando Eupergit[®] C como suporte

Foi testado o procedimento adaptado de Aslan & Tanriseven (2007), envolvendo a reação de 400 mg de Eupergit[®] C com 400 μ L da enzima em tampão fosfato de potássio. Após a imobilização, a solução foi filtrada e lavada com tampão fosfato de potássio (10 mL, 0,1 M, pH 6,6, 0,1 mM de Mg^{2+}).

3.2.1.2 - Imobilização utilizando Quitosana como suporte

O procedimento utilizado foi uma adaptação de Biró et al. (2008). Inicialmente, para o preparo das esferas, quitosana (2,5% m/v) foi dissolvida em uma solução aquosa de ácido acético (5% m/v). A solução foi gotejada para uma solução de NaOH 1 N na razão 1:10 e mantida em repouso por 20 min. As macroesferas obtidas foram filtradas e lavadas com água destilada até a neutralidade e a reticulação da enzima foi feita pela adição de 0,7 mL de glutaraldeído, 10 mL de tampão fosfato de potássio 0,05 M (pH 6,6) com 1 mM Mg^{2+} , para cada 1 g de gel, agitando-se por 1 h a 25 °C, seguindo-se a lavagem com água destilada para remoção do excesso do agente de reticulação. As esferas foram estocadas a 4 °C, em tampão. A imobilização em macroesferas de quitosana foi executada adicionando 1 g de partículas em uma mistura de 9,35 mL de tampão fosfato de potássio 0,05 M (pH 6,6) com Mg^{2+} e 0,65 mL de Lactozym[®]. A mistura foi levemente agitada a 25 °C por 3 h, então as enzimas imobilizadas foram lavadas com o mesmo tampão fosfato de potássio e estocadas em tampão a 4 °C.

3.2.1.3 – Imobilização utilizando Alginato de Cálcio como suporte

Baseou-se no método proposto por Ates & Mehmetoglu (1997). Foram preparadas três soluções: alginato 2% em água destilada, aquecida a 80 °C para solubilização; solução de cloreto de cálcio 300 mM preparada em tampão fosfato de potássio 0,05 M, pH 7; e uma solução de enzima diluída 1:3 em tampão fosfato de potássio. Adicionou-se 20 mL da solução de enzima em 20 mL de solução de alginato, homogeneizou-se e gotejou-se na solução de cloreto de cálcio para a formação de esferas com a enzima imobilizada. Após a imobilização, deixou-se em repouso por 24 h a 4 °C. Lavou-se com água destilada para posterior utilização.

3.2.1.4 – Avaliação dos resultados

Os ensaios preliminares de imobilização de Lactozym[®] foram realizados em duplicata para cada suporte.

Para cada ensaio foi calculada a recuperação da atividade enzimática na imobilização, correspondente ao percentual de atividade enzimática imobilizada em relação ao total de unidades de atividade de enzima livre utilizada na imobilização.

As atividades enzimáticas foram determinadas de acordo com o método de hidrólise da lactose descrito no item 3.2.4.1.

Os dados assim obtidos foram submetidos ao teste t a fim de verificar diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as técnicas de imobilização utilizadas quanto à eficiência de imobilização, selecionando o suporte mais adequado para a imobilização de Lactozym®.

3.2.2 – Screening de variáveis na imobilização - Planejamento Plackett-Burman

Foi proposto um Planejamento Plackett-Burman composto por 12 ensaios e 3 réplicas no ponto central. Os ensaios foram realizados variando os seguintes fatores: temperatura (10; 17,5; 25°C), pH do tampão fosfato de potássio (6,6; 7,0; 7,4), força iônica do tampão utilizado (0,1; 0,8; 1,5 M), tempo de reação (8; 16; 24 h), concentração de galactose (0; 15; 30 mg.mL⁻¹), concentração de Mg²⁺ (1; 5,5; 10 mM) e volume de enzima adicionada (0,1; 0,25; 0,4 mL), conforme a Tabela 4.2.

A resposta avaliada foi a recuperação da atividade enzimática. Os resultados obtidos foram tratados no *software* Statistica 5.0 (StatSoft Inc, USA)

3.2.3 – Caracterização da enzima livre e imobilizada

Foram avaliados os efeitos do pH e da temperatura sobre a atividade da enzima livre e imobilizada na reação de hidrólise da lactose (item 3.2.4.1), bem como avaliada a estabilidade térmica da enzima e determinados os parâmetros cinéticos e termodinâmicos das mesmas.

3.2.3.1 – Determinação do perfil de pH

Foi estudada a influência do pH na atividade das enzimas livre e imobilizada na temperatura de 37°C, testando o pH em quatro diferentes tampões no preparo da solução de lactose: acetato de sódio 50 mM (pH 4,6; 5,0; 5,6), citrato de sódio 50 mM (pH 4,6; 5,6; 6,0), fosfato de potássio 50 mM (pH 6,0; 6,6; 7,0; 7,3; 8,0) e tris-HCl 50 mM (pH 7,3; 7,6; 8,0; 8,6).

3.2.3.2 – Determinação do perfil de temperatura

A influência da temperatura na reação enzimática foi determinada através das atividades das enzimas β -galactosidase livre e imobilizada, em tampão fosfato de potássio 50 mM e pH 6,6, nas temperaturas de 25, 30, 35, 37, 40, 45, 50, 55 e 60°C sobre o substrato lactose, conforme o item 3.2.4.1.

3.2.3.3 – Estabilidade térmica

A estabilidade térmica das enzimas livre e imobilizada foi estudada em termos de meia-vida ($t_{1/2}$), constante cinética de desnaturação térmica (K_d) e energia de ativação para a reação de desnaturação (E_d). A enzima foi mantida em diferentes temperaturas na ausência de substrato, em tampão fosfato de potássio, pH 6,6, sendo determinada a atividade sobre a hidrólise da lactose (item 3.2.4.1) em intervalos de tempo pré-definidos.

Levando em consideração que em altas temperaturas a cinética de desnaturação é de 1ª ordem, pode ser obtida a Equação 3.1:

$$\frac{d[E]}{dt} = K_d[E] \quad (3.1)$$

Integrando a Equação 3.1, considerando, na equação de velocidade da reação, K_d constante quando a temperatura é mantida constante, obtém-se a Equação 3.2:

$$\ln\left(\frac{V}{V_0}\right) = -K_d t \quad (3.2)$$

Graficando $\ln(V/V_0)$ em função do tempo, determina-se o valor de K_d para cada temperatura, e com K_d calcula-se a $t_{1/2}$ da enzima, definida como sendo o tempo necessário para perder 50% de sua atividade inicial, ou seja, $V/V_0 = 0,5$. Logo, $t_{1/2}$ pode ser determinada a partir da Equação 3.3:

$$t_{1/2} = -\frac{\ln(0,5)}{K_d} \quad (3.3)$$

Sendo K_d função da temperatura na Equação de Arrhenius, conforme Equação 3.4:

$$K_d = Ae^{-\frac{E_d}{RT}} \quad (3.4)$$

Integrando a Equação de Arrhenius, obtém-se a Equação 3.5:

$$\ln(K_d) = -\frac{E_d}{R} \frac{1}{T} + \ln(A) \quad (3.5)$$

A partir da Equação de Arrhenius linearizada, através da inclinação da reta determina-se a energia de ativação da reação de desnaturação (E_d).

3.2.3.4 – Determinação dos parâmetros cinéticos K_m e $V_{m\acute{a}x}$

Para o cálculo dos parâmetros cinéticos K_m e $V_{m\acute{a}x}$ foi empregado o método gráfico de Lineweaver-Burk, a partir do modelo de Michaelis-Menten (Equação 3.6).

$$V_o = \frac{V_{m\acute{a}x} [S_o]}{K_m + [S_o]} \quad (3.6)$$

Através da linearização da Equação 3.6 se obtém a equação 3.7:

$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}} \times \frac{1}{S_o} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} \quad (3.7)$$

Graficando $1/S_o$ versus $1/V_o$, obtêm-se os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$, através dos coeficientes angular e linear da reta.

3.2.3.5 – Determinação dos parâmetros termodinâmicos

A energia livre de Gibbs (ΔG), a entalpia de inativação (ΔH) e a entropia de inativação (ΔS) foram determinadas pelas Equações 3.8, 3.9 e 3.10 (Ustok et al., 2010).

$$\Delta G = -RT \ln \left(\frac{K_d h}{KT} \right) \quad (3.8)$$

Onde R é a constante universal dos gases ($8,314 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$), T é a temperatura absoluta, h é a constante de Plank ($6,6262 \times 10^{-34} \text{ J.s}$) e K é a constante de Boltzmann ($1,3806 \times 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$).

$$\Delta H = E_d - RT \quad (3.9)$$

$$\Delta S = \left(\frac{\Delta H - \Delta G}{T} \right) \quad (3.10)$$

3.2.4 – Métodos analíticos

3.2.4.1 – Determinação da atividade de β -galactosidase livre e imobilizada utilizando como substrato lactose

A atividade das enzimas livre e imobilizada foi determinada a partir da adição, respectivamente, de 0,04 mL e 0,04 g da enzima em uma solução de lactose 5% como substrato em tampão fosfato de potássio, pH 6,6 (0,025 M KH_2PO_4 , 0,025 M Na_2HPO_4 , e 1 mM Mg^{2+}), sob agitação em banho-maria a 37°C , ou à temperatura e pH pré-determinados, de acordo com o caso. Alíquotas de aproximadamente 3 mL foram retiradas em intervalos de tempo pré-definidos (a cada 3 min e 5 min para as enzimas livre e imobilizada, respectivamente), inativadas a 100°C por 5 min e a glicose liberada foi quantificada utilizando um *kit* enzimático-colorimétrico Glicose PAP Likuiform (Labtest, Brasil), com leitura da absorbância a 505 nm. A conversão à concentração de glicose foi feita por curva de calibração previamente determinada. Uma unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol de glicose por minuto, nas condições do ensaio (adaptado de SZCZODRAK, 2000).

CAPÍTULO IV
RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Ensaio Preliminares de Imobilização

A Tabela 4.1 mostra os resultados obtidos referentes à imobilização de β -galactosidase comercial de *Kluyveromyces lactis* (Lactozym[®]) em diferentes suportes (valores médios de dois experimentos). A recuperação da atividade enzimática foi calculada com base no valor da atividade inicial da enzima β -galactosidase, determinada sobre o substrato lactose (item 3.2.4.1).

Tabela 4.1 – Testes preliminares de imobilização de β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* (Lactozym[®]) em diferentes suportes e análise estatística dos resultados (teste t)*.

Suporte	Recuperação da Atividade Enzimática (%)**
Alginato	2,43 ^b
Quitosana	6,27 ^b
Eupergit [®] C	41,86 ^a

*Letras iguais representam que não há diferenças significativas (p<0,05)

** Média

Observa-se que o suporte Eupergit[®] C mostrou-se promissor em relação aos demais suportes testados, tendo apresentado diferenças significativas a 95% de confiança em relação aos demais suportes, atingindo-se em média 41,86% de recuperação da atividade enzimática, enquanto a quitosana e o alginato não diferiram significativamente entre si (p<0,05).

Estes resultados demonstram a aplicabilidade do procedimento de imobilização em Eupergit[®] C para a enzima em estudo. Com relação aos demais suportes, os resultados obtidos foram inferiores aos mencionados na literatura.

Gaur et al. (2006) imobilizaram β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em quitosana, sendo que a recuperação enzimática após o processo de imobilização foi de 18,4%. No trabalho de Tanriseven & Dogan (2002), β -galactosidase produzida por *Aspergillus oryzae* foi imobilizada em fibras compostas de alginato e gelatina, reticuladas com glutaraldeído. Essa imobilização resultou em 56% da atividade relativa retida por 35 dias, sem decréscimo da atividade. Jordão et al. (2001), trabalhando com

células de *Kluyveromyces lactis*, contendo β -galactosidase, relataram diminuição de 4,5 vezes na atividade da enzima após imobilização em alginato.

Desta forma, optou-se por utilizar o suporte Eupergit® C na seqüência do estudo. No entanto, os demais suportes podem ser retomados em estudos posteriores, buscando a maximização da recuperação da atividade enzimática através de mudanças nas condições de imobilização.

4.2 – Planejamento Plackett-Burman para Imobilização em Eupergit® C

A matriz do Planejamento Plackett-Burman proposto está apresentada na Tabela 4.2, tendo como resposta a recuperação da atividade enzimática.

Tabela 4.2 – Matriz do Planejamento Plackett & Burman para a imobilização de β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* (Lactozym®) com valores codificados (reais) e recuperação da atividade enzimática.

Ensaio	T (°C)	pH	FI (M)	t (h)	G	Mg ²⁺	E (mL)	R (%)
					(mg/mL)	(mM)		
1	1(25)	-1(6,6)	1(1,5)	-1(8)	-1(0)	-1(1)	1(0,4)	85,02
2	1(25)	1(7,4)	-1(0,1)	1(24)	-1(0)	-1(1)	-1(0,1)	4,82
3	-1(10)	1(7,4)	1(1,5)	-1(8)	1(30)	-1(1)	-1(0,1)	26,08
4	1(25)	-1(6,6)	1(1,5)	1(24)	-1(0)	1(10)	-1(0,1)	40,18
5	1(25)	1(7,4)	-1(0,1)	1(24)	1(30)	-1(1)	1(0,4)	2,65
6	1(25)	1(7,4)	1(1,5)	-1(8)	1(30)	1(10)	-1(0,1)	11,55
7	-1(10)	1(7,4)	1(1,5)	1(24)	-1(0)	1(10)	1(0,4)	9,73
8	-1(10)	-1(6,6)	1(1,5)	1(24)	1(30)	-1(1)	1(0,4)	25,82
9	-1(10)	-1(6,6)	-1(0,1)	1(24)	1(30)	1(10)	-1(0,1)	2,86
10	1(25)	-1(6,6)	-1(0,1)	-1(8)	1(30)	1(10)	1(0,4)	10,55
11	-1(10)	1(7,4)	-1(0,1)	-1(8)	-1(0)	1(10)	1(0,4)	3,3
12	-1(10)	-1(6,6)	-1(0,1)	-1(8)	-1(0)	-1(1)	-1(0,1)	2,86
13	0(17,5)	0(7)	0(0,8)	0(16)	0(15)	0(5,5)	0(0,25)	5,26
14	0(17,5)	0(7)	0(0,8)	0(16)	0(15)	0(5,5)	0(0,25)	5,67
15	0(17,5)	0(7)	0(0,8)	0(16)	0(15)	0(5,5)	0(0,25)	5,27

T: temperatura; FI: força iônica; t: tempo; G: concentração de galactose; Mg²⁺: concentração de íons magnésio; E: volume de enzima; R: recuperação da atividade enzimática.

A análise estatística dos resultados permitiu a obtenção dos efeitos principais das variáveis estudadas sobre a recuperação da atividade enzimática, conforme Tabela 4.3.

Tabela 4.3 – Efeitos principais das variáveis sobre a recuperação da atividade enzimática.

Fator	Efeito (%)	Erro padrão	t (6)	p-valor
Média*	17,9	4,1	4,3	0,0048
Curvatura	-25,1	18,4	-1,4	0,2226
T	13,1	8,2	1,6	0,1626
pH*	-17,3	8,2	-2,1	0,0807
FI*	30,3	8,2	3,7	0,0104
T	-7,2	8,2	-0,9	0,4188
G	-12,0	8,2	-1,5	0,1965
Mg ²⁺	-13,2	8,2	-1,6	0,1591
E	6,4	8,2	0,8	0,4676

T: temperatura; FI: força iônica; t: tempo; G: concentração de galactose; Mg²⁺: concentração de íons magnésio; E: volume de enzima; R: recuperação da atividade enzimática.

* p < 0,1

Pode-se observar, a partir da Tabela 4.3, que a imobilização foi fortemente influenciada pela força iônica do meio, sendo que o aumento da concentração salina de 0,1 M para 1,5 M incrementou a resposta em cerca de 30% (p<0,1). Este efeito positivo provavelmente ocorreu devido ao aumento das forças de interações hidrofóbicas na imobilização (MARTÍN et al., 2003).

O incremento do pH de 6,6 para 7,4 provocou um efeito inverso ao da concentração salina, diminuindo em média 17,3% a recuperação da atividade de β -galactosidase em Eupergit® C. Por outro lado, os grupos epóxi do suporte podem reagir com grupos amino, sulfidril e hidroxila da enzima, formando ligações O-C e N-C extremamente estáveis (CHO et al., 2006). O aumento de pH tende a favorecer a imobilização, sendo que em valores superiores a 10 há predomínio da forma desprotonada da lisina (pK 10,7), permitindo o ataque nucleofílico aos grupos epóxi (MATEO et al., 2007). No entanto, no presente caso, a enzima tem pouca estabilidade nesta faixa de pH (superior a 10). Na faixa de estudo proposta, estariam predominando interações com os grupos amino terminal e sulfidril da enzima. Portanto, o efeito observado deve estar relacionado à estabilidade da enzima frente ao

pH, sendo que o aumento efetuado, apesar de pequeno, pode levar ao incremento da desnaturação da enzima, quando se considera o perfil de pH típico de uma β -galactosidase de levedura.

As modificações do nível inferior (-1) para o nível superior (+1) das demais variáveis estudadas resultaram em efeitos estatisticamente não significativos ($p < 0,1$) no percentual de imobilização enzimática. Nestes efeitos, o incremento de 0,1 mL para 0,4 mL no volume de enzima bem como de 10°C para 25°C na temperatura aumentaram a resposta em média 6,4% e 13,1%, respectivamente, o que é interessante, pelo melhor aproveitamento do suporte em termos de quantidade de enzima imobilizada e pela possibilidade de conduzir a técnica de imobilização sem necessidade de refrigeração. De acordo com Cho et al. (2006) o aumento da relação suporte-enzima pode implicar em um maior número de interações multipontuais por molécula de enzima presente, implicando em mudanças na estrutura globular e perda da atividade enzimática. E, apesar de temperaturas inferiores reduzirem a desnaturação, segundo Mateo et al. (2007) o uso de temperaturas moderadas pode favorecer a formação de ligações entre enzima e suporte.

Efeitos contrários, influenciando a resposta de maneira a diminuir o percentual de imobilização, resultaram do aumento na concentração de galactose, na concentração do íon Mg^{2+} e no tempo de imobilização, diminuindo em média 12,0, 13,2 e 7,2% na recuperação da atividade enzimática, respectivamente. Também aqui é vantajoso, em termos econômicos, imobilizar sem o uso de galactose (que, como inibidor competitivo, poderia proteger o centro ativo da enzima), com uma menor adição de sais de Mg^{2+} e utilizando um menor tempo.

O melhor resultado apresentado, de 85,02% de recuperação da atividade enzimática na imobilização, é referente ao ensaio 1, correspondente às seguintes condições: força iônica de 1,5 M (nível +1), pH 6,6 (nível -1), temperatura de 25°C (nível +1), tempo de imobilização de 8 h (nível -1), 1 mM de Mg^{2+} (nível -1), ausência de galactose (nível -1) e 0,4 mL de enzima livre (nível -1), corroborando com a análise de efeitos principais realizada. Esse valor de recuperação da atividade enzimática (85%) é cerca de 2 vezes superior ao valor médio obtido nos testes preliminares de imobilização da enzima em Eupergit® C (41,86%) realizados neste trabalho.

Estes resultados foram considerados promissores quando comparados aos mencionados na literatura. Zhou & Chen (2001) conseguiram cerca de 25% de imobilização de β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* (Maxilact® LX500) em grafite. Com β -galactosidase produzida por *Aspergillus oryzae*, Sun & Zhang (2009) atingiram

60,35% de recuperação da atividade enzimática após a imobilização utilizando quitosana. Haider & Husain (2009) conseguiram 96,5% de retenção da atividade de β -galactosidase de *Aspergillus oryzae*, mas utilizando um suporte com imunoafinidade (IgG-celulose).

4.3 – Caracterização das Enzimas Livre e Imobilizada

4.3.1 – Determinação do perfil de pH

A relação que existe entre a atividade enzimática com o pH para qualquer enzima depende do comportamento ácido-básico da enzima e do substrato, e ainda de outros fatores que nem sempre são fáceis de serem analisados quantitativamente (FURLONG, 2000). As curvas de variação da atividade das enzimas em diferentes valores de pH refletem o pH no qual importantes grupos doadores ou receptores de prótons no sítio catalítico estão em seus estados de ionização adequados (LEHNINGER, 1997).

A Figura 4.1 mostra o perfil de pH para as enzimas nas formas livre e imobilizada (valores médios de três experimentos).

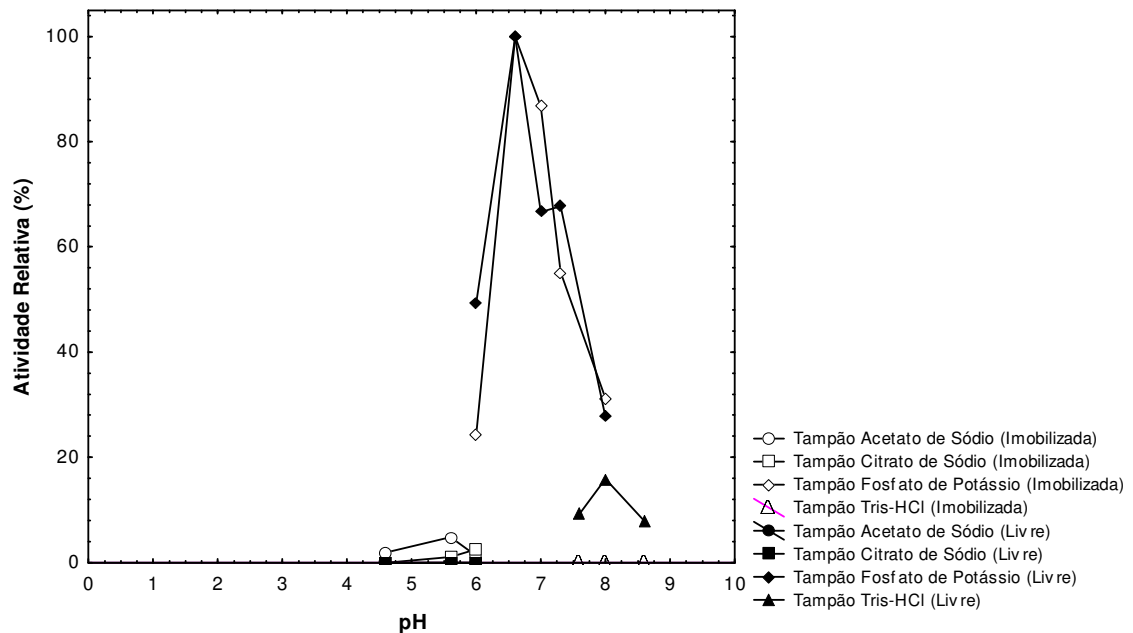


Figura 4.1 – Perfil de pH para β -galactosidase livre e imobilizada.

A maioria das enzimas apresenta um valor de pH característico em que sua atividade é máxima, em valores acima ou abaixo deste valor a atividade se reduz, podendo ocorrer desnaturação irreversível em extremos de pH. Em geral, lactases oriundas de leveduras apresentam um pH ótimo em torno de 6,0 – 7,0 (GÉKAS & LOPEZ-LEIVA, 1985), como observado neste trabalho. O pH ótimo de uma enzima depende de vários parâmetros experimentais, incluindo tempo de reação, temperatura, natureza e concentração de substrato, natureza e concentração do tampão, força iônica do meio e pureza da enzima (WHITAKER, 1994).

Comparando as enzimas livre e imobilizada, verifica-se que ambas β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* (Lactozym[®]) livre e imobilizada apresentaram pH ótimo 6,6 com queda acentuada da atividade acima e abaixo deste valor (Figura 4.1). Observa-se ainda que a enzima livre não apresentou atividade enzimática abaixo de pH 6,0, enquanto que para a enzima imobilizada houve atividade enzimática até 4,6, mesmo que reduzida. Por outro lado, a enzima, quando imobilizada, não apresentou atividade enzimática em tampão Tris-HCl (pH 7,6 a 8,6).

Ladero et al. (2000) estudaram a imobilização da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* em sílica-alumina e verificaram também que a imobilização não alterou o pH ótimo da enzima. No entanto, no trabalho de Zhou & Chen (2001), a imobilização de β -galactosidase em grafite levou a uma mudança no pH ótimo para um valor mais alcalino (7,7), comparado com a enzima livre (6,6).

Hernaiz & Crout (2000) estudaram a imobilização de β -galactosidase comercial produzida pela bactéria *Bacillus circulans* em Eupergit[®] C. Avaliando o comportamento na faixa de 4 a 7, o pH ótimo sofreu alteração de 6,0 para 5,3 com a imobilização.

4.3.2 – Determinação do perfil de temperatura

A influência da temperatura na reação enzimática foi determinada através das atividades das enzimas β -galactosidase livre e imobilizada na faixa de 25 a 60 °C, em tampão fosfato de potássio pH 6,6, conforme Figura 4.2 (valores médios referentes a três experimentos).

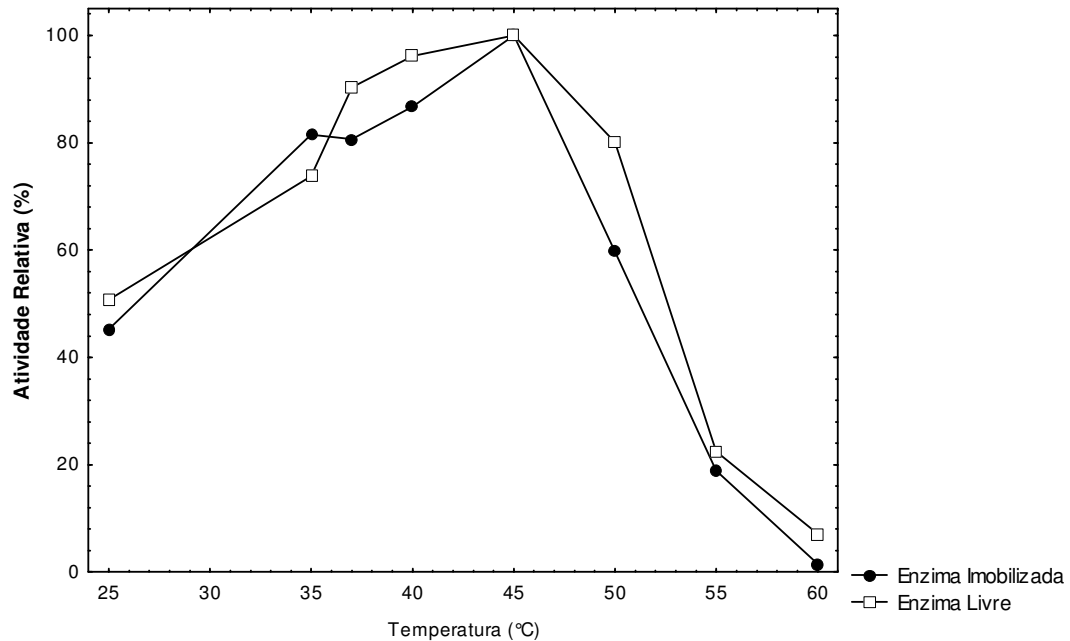


Figura 4.2 – Perfil de temperatura para β -galactosidase livre e imobilizada.

A partir dos dados apresentados, a temperatura na qual a enzima apresentou maior atividade catalítica foi a de 45°C, tanto livre quanto imobilizada. Pode-se verificar ainda que a enzima livre apresentou maiores valores de atividade entre 37 e 45°C, com uma queda acentuada acima de 45°C, associada à desnaturação proteica, comportamento similar também observado para a enzima imobilizada. As reações enzimáticas, como na maioria das reações químicas, têm sua velocidade aumentada pelo aumento da temperatura, dentro da faixa de temperatura em que a enzima é estável e mantém sua atividade integral. Ao se aumentar a temperatura, espera-se um aumento na atividade da enzima, sendo isto resultado de colisões entre enzima e substrato, este aumento na atividade cessa quando se inicia a desnaturação, ocasionada por elevadas temperaturas, quando as colisões se tornam desordenadas, tendendo ao rompimento das interações moleculares da estrutura enzimática, diminuindo sua atividade catalítica.

Ladero et al. (2001), estudando a imobilização de β -galactosidase proveniente de *Kluyveromyces fragilis* em sílica-alumina, verificaram que a máxima atividade foi alcançada a 40°C, após a enzima apresentou-se menos reativa. Segundo Alves (2008), a temperatura ótima para a β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 bruta, livre e imobilizada, foi de 37°C e 40°C, respectivamente. Quinn et al.

(2001) estudaram os efeitos da temperatura e pH na atividade catalítica da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* imobilizada em grafite, utilizando glutaraldeído como reagente de *cross-linking*. A máxima atividade enzimática ocorreu a 50°C.

4.3.3 – Cálculo da energia de ativação pela equação de Arrhenius

Para levar todas as moléculas de um mol de uma substância até o estado de transição, necessita-se de uma quantidade de energia definida como energia de ativação (E_a) (BORZANI et al., 2001). Para seu cálculo, utilizou-se os valores da atividade enzimática em função da temperatura, para ambas as enzimas livre e imobilizada (Tabelas 4.4 e 4.5), a partir da Equação 3.2.

Tabela 4.4 – Dados usados na construção do gráfico $\ln(V)$ versus $10^3/T$ para o cálculo da energia de ativação para a enzima β -galactosidase na forma livre.

T (°C)	T (K)	$10^3/T$ (K ⁻¹)	Atividade Enzimática Média (U.mL ⁻¹)*	$\ln(V)$
25	298,15	3,35	3621,78	8,19
35	308,15	3,25	6148,89	8,72
37	310,15	3,22	7531,11	8,93
40	313,15	3,19	8016,44	8,99
45	318,15	3,14	8336,00	9,03

* Valores médios de três experimentos

Tabela 4.5 – Dados usados na construção do gráfico $\ln(V)$ versus $10^3/T$ para o cálculo da energia de ativação para a enzima β -galactosidase na forma imobilizada.

T (°C)	T (K)	$10^3/T$ (K ⁻¹)	Atividade Enzimática Média (U.g ⁻¹)*	$\ln(V)$
25	298,15	3,35	1440,74	7,27
30	303,15	3,30	2032,59	7,62
35	308,15	3,25	2590,67	7,86
37	310,15	3,22	2564,44	7,85
40	313,15	3,19	2760,74	7,92
45	318,15	3,14	3180,59	8,06

* Valores médios de três experimentos

Para o cálculo da E_a para as enzimas livre e imobilizada, foi graficado $\ln(V)$ em função do inverso da temperatura (Figuras 4.3 e 4.4), que representa a forma linearizada de Arrhenius, em que o coeficiente angular corresponde a $-E_a/R$.

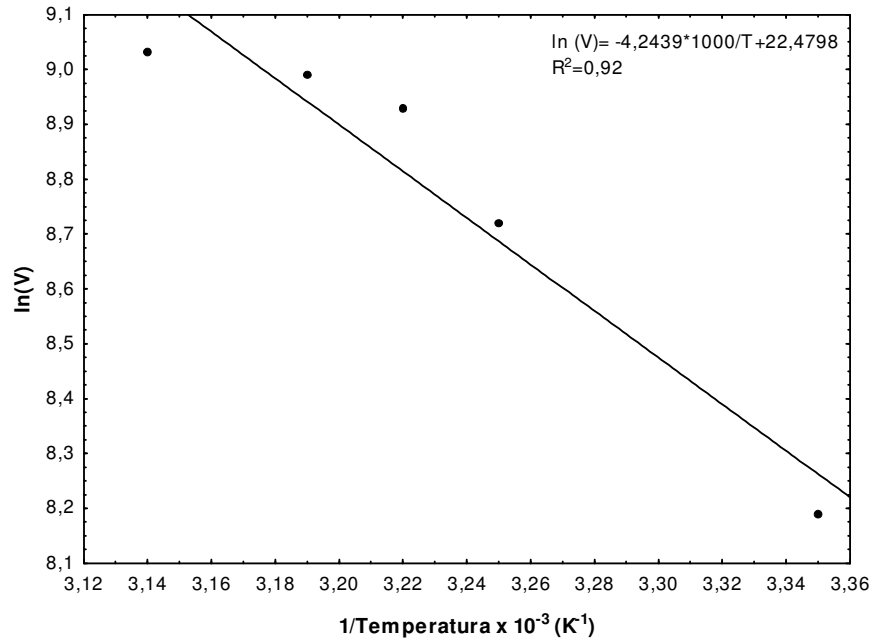


Figura 4.3 – Efeito da temperatura na atividade de β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* (Lactozym[®]) livre para o cálculo da energia de ativação.

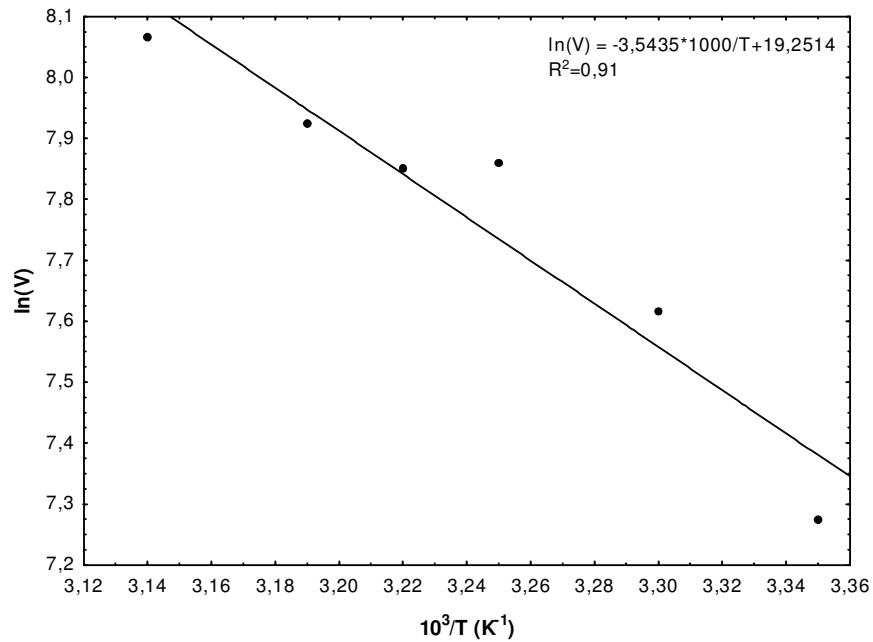


Figura 4.4 – Efeito da temperatura na atividade de β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* (Lactozym[®]) imobilizada para o cálculo da energia de ativação.

Considerando R igual a $8,314 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ e levando em consideração que o eixo das abscissas está em uma escala 10^3 , a energia de ativação calculada corresponde a $35,28 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ e $29,46 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ para as enzimas livre e imobilizada, respectivamente. Segundo Yu & Li (2006), quanto menor a energia de ativação, menor será a barreira de energia para a catálise e, conseqüentemente, menor é o tempo necessário para a obtenção da concentração de produto desejada.

De acordo com Whitaker (1994), a energia de ativação (E_a) para transformação de reagentes em produtos em reações enzimáticas está compreendida entre 6,0 e $15,0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ (correspondendo a $25,10$ a $62,76 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$). Comparado com os valores encontrados neste estudo, pode ser observado que os mesmos estão dentro dessa faixa relatada na literatura, tendo sido maior para a enzima livre.

4.3.4 – Estabilidade térmica da enzima

4.3.4.1 - Cálculo da energia de ativação para a reação de desnaturação

Para o cálculo da energia de ativação da reação de desnaturação (E_d), foi preciso determinar o valor de K_d para cada temperatura, graficando $\ln(V/V_0)$ em função do tempo. Conforme a Equação 3.2, K_d corresponde ao coeficiente angular da reta. Os valores de K_d obtidos na faixa de 30°C a 45°C estão apresentados nas Tabelas 4.6 e 4.7, para as enzimas livre e imobilizada, respectivamente, sendo utilizados para construção dos gráficos apresentados nas Figuras 4.5 e 4.6.

Tabela 4.6 – Dados usados na construção do gráfico $-\ln(K_d)$ versus $10^3/T$ (K^{-1}) para o cálculo da energia de ativação da reação de desnaturação para a enzima β -galactosidase na forma livre.

T ($^\circ\text{C}$)	T (K)	$10^3/T$ (K^{-1})	K_d (h^{-1})*	$-\ln(K_d)$
30	303,15	3,30	0,0088	4,74
35	308,15	3,25	0,0274	3,6
40	313,15	3,19	0,0768	2,6
45	318,15	3,14	1,5989	-0,47

* Valores médios de dois experimentos

Tabela 4.7 – Dados usados na construção do gráfico $-\ln(K_d)$ versus $10^3/T$ (K^{-1}) para o cálculo da energia de ativação da reação de desnaturação para a enzima β -galactosidase na forma imobilizada.

T ($^{\circ}C$)	T (K)	$10^3/T$ (K^{-1})	K_d (h^{-1})*	$-\ln(K_d)$
30	303,15	3,30	0,0085	4,77
35	308,15	3,25	0,0099	4,61
40	313,15	3,19	0,0264	3,64
45	318,15	3,14	0,3908	0,94

* Valores médios de dois experimentos

A constante cinética de desnaturação térmica (K_d) é inversamente proporcional à estabilidade térmica da enzima, ou seja, quanto menor o valor de K_d maior é a estabilidade (LEHNINGER, 1997). Neste estudo, a enzima livre apresentou maiores valores de K_d , comparada à enzima imobilizada, demonstrando o aumento da estabilidade térmica devido ao processo de imobilização.

ALBAYRAK & YANG (2002) compararam as enzimas β -galactosidase livre e imobilizada em fibras de algodão quanto à estabilidade térmica. Foram estudadas as temperaturas de 40°C, 50°C e 60°C. As constantes de desnaturação térmica (K_d) determinadas foram iguais a 0,0017, 0,0141 e 0,3325 h^{-1} , para a enzima livre, e 0,00007, 0,00060 e 0,01420 h^{-1} , para a enzima imobilizada.

Sendo K_d função da temperatura de reação, segundo a equação de Arrhenius (Equação 3.4), para a determinação da energia de ativação da reação de desnaturação E_d , graficou-se $-\ln(K_d)$ versus $10^3/T$, conforme apresentado nas Figuras 4.5 e 4.6, obtendo-se uma reta correspondente à equação linearizada de Arrhenius, onde o coeficiente angular corresponde a E_d/R .

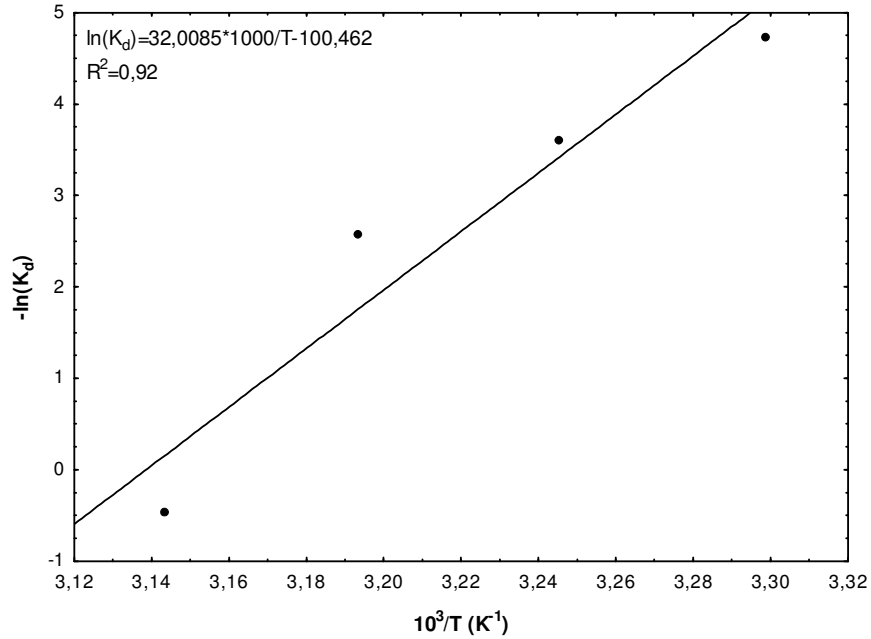


Figura 4.5 – Dados experimentais das constantes de desnaturalização térmica $-\ln(K_d)$ em função do inverso da temperatura para o cálculo da energia de ativação da reação de desnaturalização (E_d) da enzima livre.

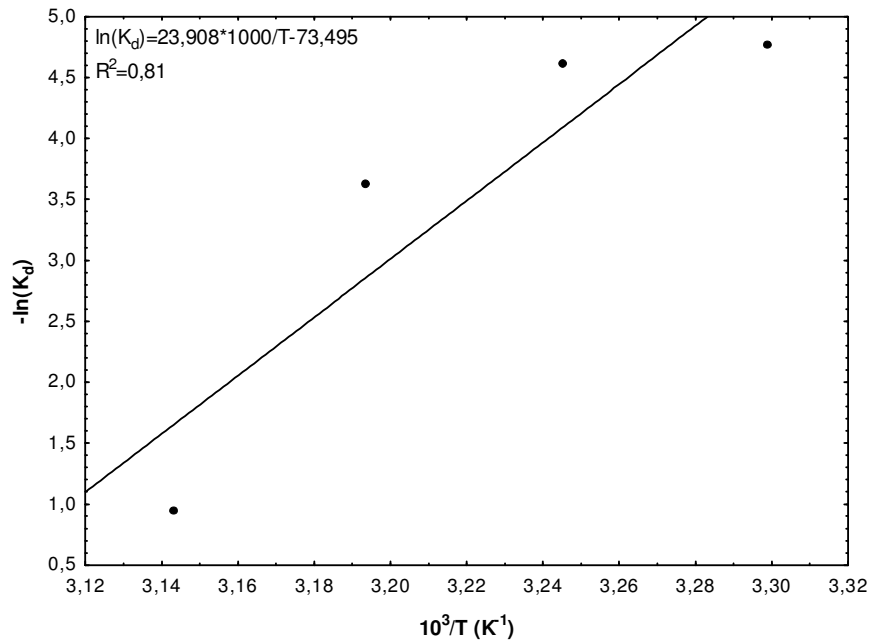


Figura 4.6 – Dados experimentais das constantes de desnaturalização térmica $-\ln(K_d)$ em função do inverso da temperatura para o cálculo da energia de ativação da reação de desnaturalização (E_d) da enzima imobilizada.

Considerando R igual a $8,314 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$, as energias de ativação para a reação de desnaturação determinadas para as enzimas livre e imobilizada foram, respectivamente, $266,12 \text{ kJ.mol}^{-1}$ e $198,77 \text{ kJ.mol}^{-1}$

Segundo Whitaker (1994), a energia de ativação para a reação de desnaturação da enzima fica compreendida entre 50 e $150 \text{ kcal.mol}^{-1}$ (cerca de $209,21 \text{ kJ.mol}^{-1}$ a $627,62 \text{ kJ.mol}^{-1}$). Alves (2008), caracterizando a β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 quanto à estabilidade térmica, obteve energias de ativação de 100 e $106 \text{ kcal.mol}^{-1}$ (iguais a $418,4 \text{ kJ.mol}^{-1}$ e $443,5 \text{ kJ.mol}^{-1}$) para as enzimas livre e imobilizada, respectivamente. Quinn et al. (2001) estudaram a imobilização da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* em grafite, utilizando glutaraldeído como reagente de *cross-linking*. A energia de ativação para a reação de desnaturação encontrada para a enzima imobilizada foi de $47,5 \text{ kcal.mol}^{-1}$ (igual a 199 kJ.mol^{-1}). Os valores de E_d para as enzimas em estudo estão de acordo com os valores relatados na literatura.

4.3.4.2 – Meia-vida

A meia-vida da enzima ($t_{1/2}$) é definida como sendo o tempo necessário para a enzima perder 50% de sua atividade inicial, sendo calculado a partir da Equação 3.3 a partir dos valores de K_d . Os valores obtidos são mostrados na Tabela 4.8.

Tabela 4.8 - Meia-vida para enzima livre e imobilizada nas diferentes temperaturas e fatores de estabilização (F).

T (°C)	$t_{1/2Liv}$ (h)	$t_{1/2Imob}$ (h)	F
30	79,80	82,04	1,03
35	25,30	70,18	2,77
40	9,03	26,38	2,91
45	0,43	1,78	4,14

* Valores médios de dois experimentos

Liv: enzima livre; Imob: enzima imobilizada

Observa-se que os valores de meia-vida diminuíram com o aumento da temperatura na faixa de 30°C a 45°C , tanto para enzima livre (de $79,80 \text{ h}$ para $0,43 \text{ h}$) como para a enzima imobilizada (de $82,04 \text{ h}$ para $1,78 \text{ h}$), bem como a maior redução no tempo de meia-vida foi observada na passagem de 40°C para 45°C (cerca de 21 e

15 vezes, para as enzimas livre e imobilizada, respectivamente). Estes comportamentos eram esperados, evidenciando a severa perda de estabilidade com o aumento da temperatura. Pode-se perceber ainda que a enzima imobilizada apresentou uma maior estabilidade quando comparada à enzima livre. Observa-se que os valores para o fator de estabilidade, correspondentes à razão entre a meia-vida da enzima imobilizada e livre (KNEZEVIC et al., 2006), variaram de 1,03 (30°C) a 4,14 (45°C), representando um importante ganho de estabilidade devido à imobilização, principalmente em temperaturas mais elevadas. De acordo com Reguly (2000), geralmente as enzimas imobilizadas são mais estáveis a mudanças de pH e temperatura do que as mesmas enzimas sob a forma solúvel. Mesmo quando suspensas em água, estas enzimas insolubilizadas por imobilização permanecem estáveis e ativas por meses, possibilitando seu reuso.

Giacomini et al. (2001) estudou a imobilização em gel de agarose, utilizando a enzima β -galactosidase produzida por *Kluyveromyces lactis*, e o tempo de meia-vida encontrado foi 0,4 h a 45 °C.

As indústrias requerem enzimas que tenham altas produtividade e estabilidade para usos repetidos e por período extenso. Desta forma, com os resultados obtidos pode-se afirmar que a imobilização de β -galactosidase Lactozym[®] em Eupergit[®] C é promissora.

4.3.5 - Determinação dos parâmetros cinéticos K_m e $V_{máx}$

Para determinação dos parâmetros cinéticos K_m e $V_{máx}$ foi utilizada uma faixa de concentração de 10 a 70 g.L⁻¹ (29,2 a 204,7 mM) de lactose para medida da atividade enzimática, tanto da enzima livre como da enzima imobilizada. Os resultados obtidos para os diagramas de Lineweaver-Burk, plotando o inverso da atividade enzimática *versus* o inverso da concentração inicial de substrato, são apresentados nas Figuras 4.7 e 4.8.

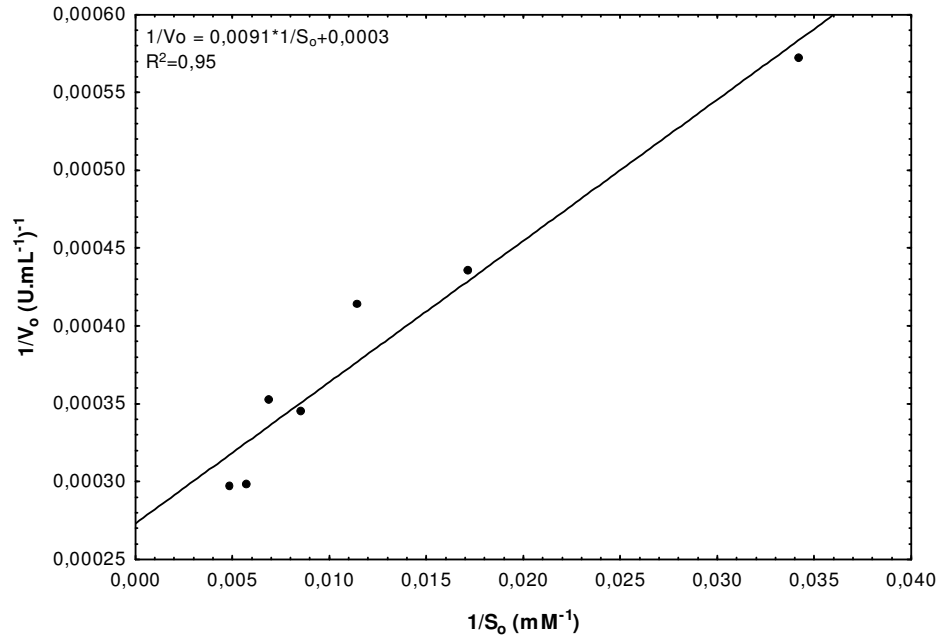


Figura 4.7 – Diagrama de Lineweaver-Burk aplicado aos dados experimentais para β -galactosidase livre.

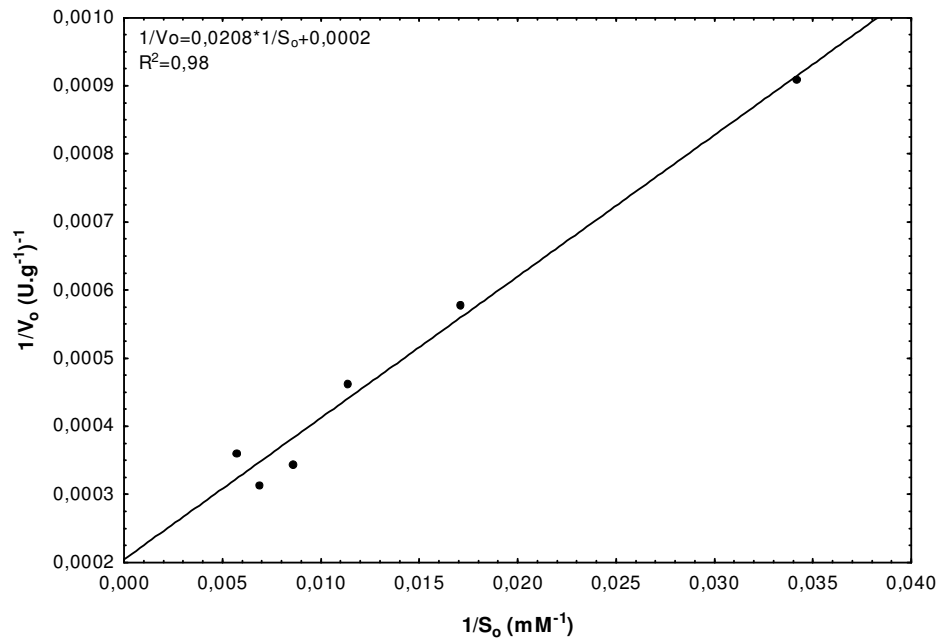


Figura 4.8 - Diagrama de Lineweaver-Burk aplicado aos dados experimentais para β -galactosidase imobilizada.

Considerando a Equação 3.7, calcularam-se os parâmetros K_m e $V_{m\acute{a}x}$, como sendo 30,33 mM e 3333,33 U.mL⁻¹ para enzima livre, e 104,00 mM e 5000,00 U.mL⁻¹ para a enzima imobilizada, sendo possível expressar o modelo de Michaelis-Menten pelas seguintes expressões, Equações 4.1 e 4.2, respectivamente, para as enzimas livre e imobilizada:

$$V_{0Liv} = \frac{3333,33[S_0]}{30,33 + [S_0]} \quad (4.1)$$

$$V_{0Imob} = \frac{5000,00[S_0]}{104,00 + [S_0]} \quad (4.2)$$

A partir destas equações foi possível calcular os valores de atividade enzimática preditas pelo modelo na faixa de concentração estudada, conforme mostrado nas Figuras 4.9 e 4.10.

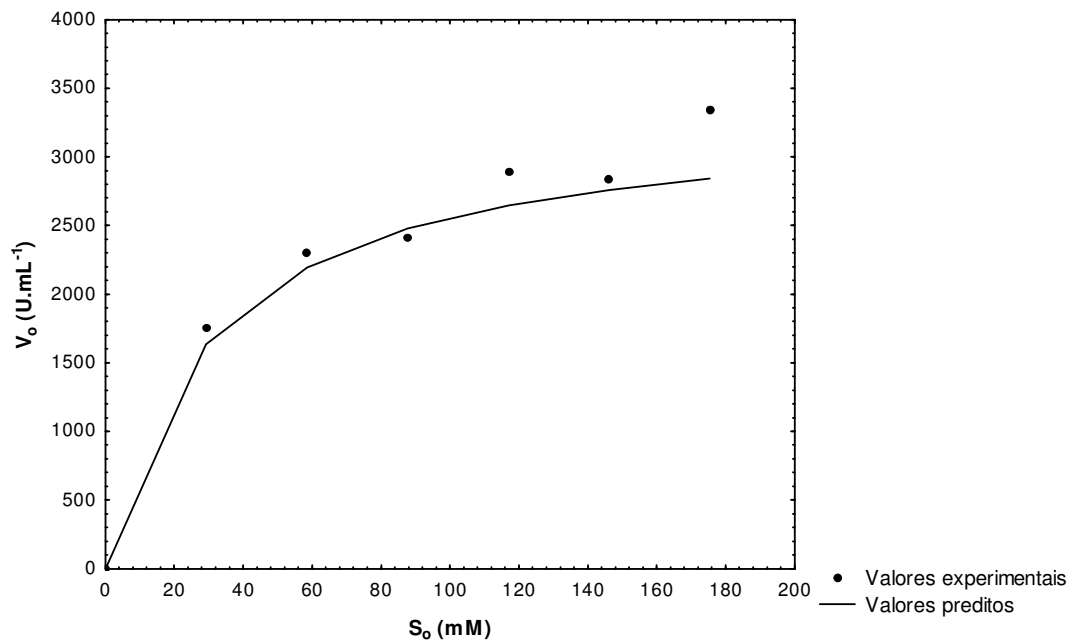


Figura 4.9 – Valores experimentais e preditos pelo modelo de Michaelis-Menten para atividade enzimática em função da concentração de lactose (β -galactosidase livre).

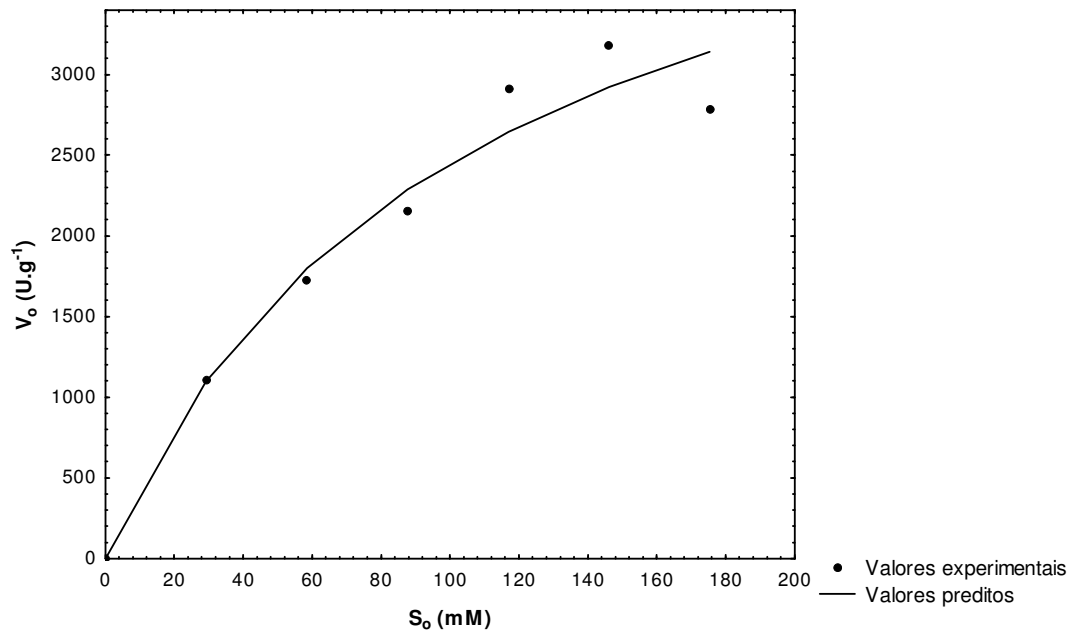


Figura 4.10 – Valores experimentais e preditos pelo modelo de Michaelis-Menten para atividade enzimática em função da concentração de lactose (β -galactosidase imobilizada).

Esses gráficos sugerem que em concentrações de substrato muito baixas, a velocidade da reação é muito baixa, aumentando com o aumento da concentração de substrato. Testando o efeito de concentrações cada vez maiores, medindo a velocidade a cada aumento da concentração, os aumentos da velocidade serão cada vez menores, conferindo uma aproximação lenta e gradual do estado de saturação da enzima pelo substrato (LEHNINGER, 1997).

Pode-se observar ainda que os dados experimentais para enzima livre e imobilizada ajustaram-se bem ao modelo de Michaelis-Menten (R^2 de 0,95 e 0,98, respectivamente), e que o valor de K_m para a enzima imobilizada foi cerca de 3,4 vezes maior do que para a enzima livre. A imobilização frequentemente leva a um importante aumento nos valores de K_m com relação aos encontrados para a enzima solúvel, representando uma diminuição da afinidade da enzima pelo substrato que pode estar relacionada a fatores estereo-conformacionais (GIACOMINI et al., 2001), provavelmente causada por mudanças estruturais introduzidas pelo procedimento de imobilização e pela diminuição da acessibilidade do substrato ao sítio ativo da enzima imobilizada (HERNAIZ & CROUT, 2000).

Hernaiz & Crout (2000) estudaram a imobilização de β -galactosidase comercial de *Bacillus circulans* em Eupergit® C. Os valores de K_m encontrados para as enzimas livre e imobilizada foram, respectivamente, 5 e 14,2 mM. Quinn et al. (2001), imobilizando a enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* em grafite, utilizando glutaraldeído como reagente de *cross-linking*, determinaram o parâmetro cinético K_m para as enzimas livre e imobilizada iguais a 1,74 mM e 9,34 mM, respectivamente. Alves (2008) obteve valores de K_m de 93,7 mM e 115,7 mM para a enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT7082 livre e imobilizada em alginato de cálcio, respectivamente.

4.3.6 - Determinação dos parâmetros termodinâmicos

A Tabela 4.9 mostra a estimativa dos parâmetros termodinâmicos calculados a partir das Equações 3.8, 3.9 e 3.10, utilizando as constantes de desnaturação térmica (K_d) e energia de ativação da reação de desnaturação (E_d) determinadas experimentalmente para as enzimas livre e imobilizada.

Tabela 4.9 – Parâmetros termodinâmicos (ΔH , ΔG e ΔS) calculados para as enzimas livre e imobilizada.

<i>T</i> (K)	<i>Enzima Livre</i>			<i>Enzima Imobilizada</i>		
	ΔH (kJ.mol ⁻¹)	ΔG (kJ.mol ⁻¹)	ΔS (kJ.mol ⁻¹ .K ⁻¹)	ΔH (kJ.mol ⁻¹)	ΔG (kJ.mol ⁻¹)	ΔS (kJ.mol ⁻¹ .K ⁻¹)
303	263,60	106,85	0,52	196,25	106,94	0,29
308	263,56	105,75	0,51	196,21	108,36	0,29
313	263,52	104,82	0,51	196,17	107,60	0,28
318	263,47	98,51	0,52	196,12	102,23	0,30

T: Temperatura, em Kelvin (K); ΔH : Entalpia; ΔG : Energia livre de Gibbs; ΔS : Entropia.

A estimativa dos parâmetros termodinâmicos ajuda a entender o provável mecanismo da desnaturação, que é extremamente importante em processos enzimáticos (USTOK et al., 2010). De acordo com Blanch & Clark (1997), citados por Oliveira (2007), a diminuição da energia livre (ΔG) do sistema pode estar relacionada à diminuição da disponibilidade de sítios reativos pela desnaturação e à mudança na sua conformação inicial. A entalpia (ΔH) e entropia (ΔS) são as variações de calor e desordem, respectivamente. Estes dois parâmetros fornecem o número de ligações

não-covalentes quebradas e a desordem associada com a formação do estado de transição (MANERA et al., 2009).

Desta forma, pode-se observar na Tabela 4.9, pelos valores de energia livre de Gibbs (ΔG), que com o aumento da temperatura houve uma redução da energia livre para ambas as enzimas livre e imobilizada, mostrando que a estabilidade térmica diminuiu. Também os valores de ΔG para a enzima imobilizada foram superiores quando comparados com a enzima livre, mostrando maior estabilidade térmica para a enzima imobilizada.

Para a entalpia (ΔH), pode-se observar que seu valor praticamente não se alterou com o aumento da temperatura, o que indica que a entalpia não é fortemente dependente da temperatura na faixa de estudo avaliada, comportamento este também observado por Oliveira (2007) para frutossiltransferase produzida por *Rhodotorula* sp.

Os valores ΔS foram baixos (em torno de 0,5 e 0,29 para as enzimas livre e imobilizada, respectivamente) e não foi possível observar uma variação (aumento) clara com a temperatura. O valor de ΔS , como sendo positivo, indica que a desordem do sistema aumenta conforme a enzima se desnatura, já que com o incremento da temperatura ocorre um maior número de quebra das ligações. De acordo com Ustok et al. (2010), valores de ΔS próximos a zero, como no presente caso, mostram que a inativação térmica não implicou em alteração relevante na estrutura terciária da enzima, o que significa que a maioria das pontes de hidrogênio responsáveis pela estrutura ativa do sítio catalítico da enzima está ainda presente no complexo ativado. O incremento na entropia corresponde a um aumento da desordem na desnaturação, relacionado ao desenovelamento da cadeia polipeptídica, levando a uma estrutura mais desordenada.

É surpreendentemente baixo o número de informações publicadas tratando de parâmetros termodinâmicos para inativação de enzimas. Os valores de ΔG estão na ordem de magnitude esperada para esse tipo de reação (94,2-108,2 kJ.mol⁻¹). Altos valores de entalpia também são características da reação de desnaturação protéica (ORTEGA et al., 2004).

MANERA et al. (2009) determinaram os parâmetros termodinâmicos das enzimas β -galactosidase produzidas pelas leveduras *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045 e CCT 7082. A energia livre de Gibbs foi de 108,2 kJ.mol⁻¹ (a 35 °C) e 94,2 kJ.mol⁻¹ (a 55 °C), para ATCC 16045, e foi de 107,0 kJ.mol⁻¹ (30 °C) e 94,8 kJ.mol⁻¹ (50 °C) para CCT 7082. A entalpia e entropia foram, para ATCC 16045, iguais a 323,9

$\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ e $0,700 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$, respectivamente; para CCT 7082, esses parâmetros, entalpia e entropia, foram iguais a $313,8 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ e $0,682 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$, respectivamente.

CAPÍTULO V
CONCLUSÕES GERAIS

5 – CONCLUSÕES

Dentre os suportes testados para imobilização de β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* (Lactozym[®]), Eupergit[®] C foi o que apresentou o maior valor de recuperação da atividade enzimática, diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) dos demais suportes (Quitosana e Alginato), sendo selecionado como o mais promissor.

A força iônica e o pH foram as variáveis que apresentaram efeito significativo ($p < 0,1$) na imobilização de β -galactosidase comercial de *Kluyveromyces lactis* (Lactozym[®]) em Eupergit[®] C, sendo que o aumento da força iônica de 0,1 para 1,5 M e o aumento do pH de 6,6 para 7,4 representaram aumento de 30% e redução de 17,3% na recuperação da atividade enzimática. Na temperatura de 25°C, tampão fosfato de potássio 1,5 M, pH 6,6, concentração de Mg^{2+} 1 mM, 0,4 mL de enzima e tempo de reação de 8 h, sem adição de galactose, atingiu-se 85,02% de recuperação da atividade enzimática, relacionada à hidrólise da lactose.

Quanto à caracterização das enzimas livre e imobilizada, não foram observadas diferenças quanto ao pH e temperatura ótimos, sendo de 6,6 e 45°C, respectivamente. Houve um ganho de estabilidade térmica significativa com a imobilização, tendo-se observado um aumento de cerca de 4 vezes na meia-vida da enzima quando imobilizada a 45°C.

Os valores de K_m , de 30,33 mM e 104,00 mM para as enzimas livre e imobilizada, respectivamente, representaram uma diminuição da afinidade da enzima pelo substrato com a imobilização, possivelmente por fatores estéricos e conformacionais.

Os parâmetros termodinâmicos Energia livre de Gibbs (ΔG), entalpia (ΔH) e entropia (ΔS) foram calculados para diferentes temperaturas, evidenciando novamente a maior estabilidade térmica da enzima imobilizada e indicando que a perda de estabilidade de ambas enzimas, livre e imobilizada, provavelmente não está associada a alterações relevantes na estrutura terciária.

Desta forma, a imobilização β -galactosidase comercial de *Kluyveromyces lactis* (Lactozym[®]) em Eupergit[®] C mostrou-se satisfatória, com melhoria em propriedades bioquímicas e térmicas que podem representar vantagens na utilização em escala comercial, compensando custos adicionais.

CAPÍTULO VI
SUGESTÕES

6 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar a inibição enzimática promovida pela glicose e galactose na hidrólise da lactose, comparando os efeitos inibitórios na enzima livre e imobilizada em Eupergit[®] C;

- Comparar o desempenho da enzima β -galactosidase comercial de *Kluyveromyces lactis* (Lactozym[®]) na forma livre e na forma imobilizada em Eupergit[®] C, quanto ao grau de hidrólise da lactose presente no soro em reator em batelada, verificando os efeitos do pH e temperatura no grau de hidrólise do soro no reator e a estabilidade operacional das enzimas;

- Estudar a estabilidade da enzima imobilizada durante a estocagem, sob refrigeração e à temperatura ambiente;

- Avaliar a adequação do suporte Eupergit[®] C para imobilização de outras enzimas de interesse industrial.

CAPÍTULO VII
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBAYRAK, N.; YANG, S. Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase on tosylated cotton cloth. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 371-383, 2002.

ALMEIDA, M. M.; PASTORE, G. M. Galactooligossacarídeos – Produção e efeitos benéficos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 35, p. 12–19, 2001.

ALPTEKIN, O.; TUKEL, S.S.; YILDIRIM, D.; ALAGOZ, D. Immobilization of catalase onto Eupergit C and its characterization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 64, p. 177-183, 2010.

ALVES, F. G. **Produção de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT7082 em fermentador e caracterização parcial da enzima livre e imobilizada.** Rio Grande, 2008. 96 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande.

ARROYO, M. Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica*; p23-39, 1998.

ASLAN, Y.; TANRISEVEN, A. Immobilization of Pectinex Ultra SP-L to produce galactooligosaccharides. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 45, p. 73-77, 2007.

ATES, S.; MEHMETOGLU, U. A new method for immobilization of β -galactosidase and its utilization in a plug flow reactor. **Process Biochemistry**, v. 32, p. 433-436, 1997.

BAILEY, J.E.; OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. 2^a ed. New York: Editora McGraw-Hill, 1986.

BARON, A. **Preparação e caracterização de lipases imobilizadas para utilização em biocatálise.** Curitiba, 2008. 154 f. Tese. Universidade Federal do Paraná.

BICKERSTAFF, G. F. **Immobilization of Enzymes and Cells**. Methods in Biotechnology. New Jersey: Humana Press, 1997. 367 p.

BIRÓ, E.; NÉMETH, A. S.; SISAK, C.; FECZKÓ, T.; GYENIS, J. Preparation of chitosan particles suitable for enzyme immobilization. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 70, p. 1240-1246, 2008.

BISSET, F.; STERNBERG, D. Immobilization of *Aspergillus* beta-glucosidase on chitosan. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 35, p. 750-755, 1978.

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial**. V. 1. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 2001.

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; SILVA, J.B.A. Biocatalisadores imobilizados: uso de células e enzimas imobilizadas em processos biotecnológicos. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, p.48-58, 2006.

CARRARA, C. R.; RUBIOLO, A. C. Immobilization of beta-galactosidase on chitosan. **Biotechnology Progress**, v. 10, p. 220-224, 1994.

CHATTERJEE, S.; ADHYA, M.; GUHA, A. K.; CHATTERJEE, B.P. Chitosan from *Mucor rouxii*: production and physico-chemical characterization. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 395-400, 2005

CHO, Y. J.; PARK, O. J.; SHIN, H. J. Immobilization of thermostable trehalose synthase for the production of trehalose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 108-113, 2006.

CORCORAN, E. The production and use of immobilized living microbial cells. In: WISEMAN, A. **Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology**, p. 12-50, 1985.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, p. 623-630, 2004.

DORAN, P. M. **Bioprocess Engineering Principles**. Academic Press, 2002. 439 p.

DWEVEDI, A.; KAYASTHA, A. M. Optimal immobilization of β -galactosidase from Pea (PsBGAL) onto Sephadex and chitosan beads using response surface methodology and its applications. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 2667-2675, 2009.

FREEMAN, A.; LILLY, M. D. Effect of processing parameters on the feasibility and operational stability of immobilized viable microbial cells. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, p. 335-345, 1998.

FURLONG, E. B. **Bioquímica: um enfoque para alimentos**. 1ª edição. Rio Grande: EDGRAF Editora e Gráfica da Fundação Universidade Federal do Rio Grande, 2000. 172 p.

GAUR, R.; PANT, H.; JAIN, R.; KHARE, S.K. Galacto-oligosaccharide synthesis by immobilized *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. **Food Chemistry**, v. 97, p. 426-430, 2006.

GEKAS, V.; LOPEZ-LEIVA, M. Hydrolysis of lactose: a literature review. **Process Biochemistry**, v. 20, p. 2-12, 1985.

GIACOMINI, C.; VILLARINO, A.; FRANCO-FRAGUAS, L.; BATISTA-VIEIRA, F. Immobilization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* on sílica and agarose: comparison of different methods. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 4, p. 313-327, 1998.

GIACOMINI, C.; IRAZOQUI, G.; BATISTA-VIERA, F.; BRENA, B.M. Influence of the immobilization chemistry on the properties of immobilized β -galactosidases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, p. 597–606, 2001.

GROSOVÁ, Z.; ROSENBERG, M.; REBROS, M. Perspectives and Applications of Immobilised β -Galactosidase in Food Industry – a Review. **Czech Journal Food Science**, 26: 1–14, 2007.

GUIBAL, E.; VINCENT, T.; SPINELLI, S. Environmental of chitosan-supported catalysts: catalytic hollows fibers for the degradation of phenolic derivates. **Separation Science and Technology**, v. 40, p. 633-657, 2005.

HAIDER, T.; HUSAIN, Q. Calcium alginate entrapped preparations of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase: its stability and applications in the hydrolysis of lactose. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 41, p. 72-80, 2007.

HAIDER, T.; HUSAIN, Q. Immobilization of β galactosidase from *Aspergillus oryzae* via immunoaffinity support. **Biochemical Engineering Journal**, v. 43, p. 307-314, 2009.

HEO; TAE-RUEO; LEE. Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salt solution. **Applied and Environmental Microbiology**, 66: 869-873, 2000.

HERNAIZ, M. J.; CROUT, D. H. G. Immobilization/stabilization on Eupergit C of the β -galactosidase from *B. circulans* and an α -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 26-32, 2000.

JORDÃO, R.B.; BRANDI, I.V.; PASSOS, F.M.L. Stabilization of the activity of beta-galactosidase in permeabilized immobilized cells for hydrolysis of lactose in milk. **Journal of Food Biochemistry**, v. 25, p. 257-266, 2001.

JUNIOR, W. C. S. **Imobilização de células permeabilizadas de *Debaryomyces hansenii* UFV-1 em alginato de cálcio e sua aplicação na hidrólise de galactooligossacarídeos**. Viçosa, 2006. 83 f. Dissertação (Pós-graduação em Bioquímica Agrícola). Universidade Federal de Viçosa.

KATCHALSKI-KATZIR, E.; KRAEMER, D. M. Eupergit C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 10, p. 157–176, 2000.

KNEZEVIC, Z.; MILOSAVIC, N.; BEZBRADICA, D.; JAKOVLJEVIC, Z.; PRODANOVIC, R. Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Eupergit® C

supports by covalent attachment. **Biochemical Engineering Journal**, v. 30, p. 269–278, 2006.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 126-139, 2004.

LADERO, M.; SANTOS, A.; GARCÍA – OCHA, F. Kinetic modeling of lactose hydrolysis with an immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbiology Technology**, v. 27, p. 583 – 592. 2000.

LEHNINGER, A. L. **Bioquímica**. V. 1. São Paulo: Editora Edgard Blüncher, 1997.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial**. V. 3. São Paulo: Editora Edgar Blücher, 2001.

MANERA, A.P.; BRAGA, A.R.C.; SALA, L.; GOMES, P.A.; ORES, J.C. FILHO, F.M.; KALIL, S.J. Propriedades enzimáticas da β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045 e CCT 7082. In: IX Simpósio de hidrólise enzimática de biomassas, Maringá, PR, 2009.

MARIOTTI, M. P.; YAMANAKA, H.; ARAUJO, A. R.; TREVISAN, H. C. Hydrolysis of whey lactose by immobilized β -galactosidase. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, p. 1233-1240, 2008.

MARTÍN, M. T.; PLOU, F. J.; ALCALDE, M.; BALLESTEROS, A. Immobilization on Eupergit C of cyclodextrin glucosyltransferase (CGTase) and properties of the immobilized biocatalyst. **Journal Molecular Catalysis. B: Enzymatic**, v. 21, p. 299–308, 2003.

MARTINS, A. R.; BURKERT, C. A. V. Galacto-oligossacarídeos (GOS) e seus efeitos prebióticos e bifidogênicos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 12, p. 230-240, 2009.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques – A review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1451–1463, 2007.

MEERSMAN, E. Use of monolayer carrier in brewery. **Cerevisiae and Biotechnology**, v. 17, p. 55-56, 1992.

MODELL, M.; REID, R. C. **Thermodynamics and its applications**. 2nd ed. Prentice-Hall, 1983. 448 p.

NAGANAGOUDA, K.; MULINAMI, V. H. Gelatin blends with alginate: gel fibers for α -galactosidase immobilization and its application in reduction of non-digestible oligosaccharides in soymilk. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1903-1907, 2006.

NAKKHARAT, P.; HALTRICH, D. β -galactosidase from *Talaromyces thermophilus* immobilized on to Eupergit C for production of galacto-oligosaccharides during lactose hydrolysis in batch and packed-bed reactor. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 23, p. 759-764, 2006.

NERI, D.F.M. **Immobilization of β -galactosidase onto different water insoluble matrices**. Guimarães, 2008. 163 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica). Universidade do Minho.

OLIVEIRA, E. A. **Imobilização da enzima frutossiltransferase extracelular de *Rhodotorula sp.* e aplicação na produção de frutooligossacarídeos**. Campinas, 2007. 112 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas.

ORTEGA, N.; DIEGO, S.; PEREZ-MATEOS, M.; BUSTO, M. D. Kinetic properties and thermal behavior of polygalacturonase used in fruit juice clarification. **Food Chemistry**, v. 88, p. 209-217, 2004.

PESELA, B. C. C.; DELLAMORA-ORTIZ, G.; BETANCOR, L.; FUENTES, M.; GUISÁN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Modulation of the catalytic properties of

multimeric β -galactosidase from *E. coli* by using different immobilization protocols. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 310-315, 2007.

QUINN, Z.K.Z.; CHEN, X.D. Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 9, p. 33-40, 2001.

REED, G; NAGODAWITHANA, T. **Enzymes in food processing**. 3th ed. New York: Academic Press, 1993.

REGULY, J. C. **Biotechnologia dos processos fermentativos**. V. 3. Pelotas: Editora e Gráfica Universitária - UFPEL, 2000.

REUTER, S.; NYGAARD, A. R.; ZIMMERMANN, W. β -galactooligosaccharides synthesis with β -galactosidases from *Sulfolobus sulfataricus*, *Aspergillus oryzae* and *Escherichia coli*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, p. 509-516, 1999.

ROY, I.; GUPTA, M. N. Lactose hydrolysis by Lactozym™ immobilized on cellulose beads in batch and fluidized bed modes. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 325-332, 2003.

SANGEETHA, P.T.; RAMESH, M. N.; PRAPULLA, S.G.; Fructooligosaccharide production using fructosyl transferase obtained from recycling culture of *Aspergillus oryzae* CFR 202. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1085-1088, 2005.

SERIO, M. D.; MATURO, C.; ALTERIIS, E. D.; PARASCANDOLA, P.; TESSER, R.; SANTACESARIA, E. Lactose hydrolysis by immobilized β -galactosidase: the effect of the supports and the kinetics. **Catalysis Today**, 79-80: 333-339, 2003.

STAMATIS, H.; KALOGERIS, E.; SANAKIS, Y.; MAMMA, D.; CHRISTAKOPOULOS, P. Properties of catechol 1,2-dioxygenase from *Pseudomonas putida* immobilized in calcium alginate hydrogels. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 1113-1121, 2006.

SUN, S. F.; ZHANG, Y. A novel process to prepare chitosan microspheres without shrinkage and its application to immobilize β -galactosidase. **E-Journal of Chemistry**, v. 6, p. 1211-1220, 2009.

SZCZODRAK, J. Hydrolysis of lactose in whey permeate by immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 10, p. 631-637, 2000.

TANRISEVEN, A.; DOGAN, S. A novel method for the immobilization of β -galactosidase. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 27-30, 2002.

USTOK, F.I.; TARI, C.; HARSA, S. Biochemical and thermal properties of β -galactosidase enzymes produced by artisanal yoghurt cultures. **Food Chemistry**, v. 119, p. 1114–1120, 2010.

VINU, A. MIYAHARA, M. ARIGA, K. Biomaterial immobilization in nanoporous carbon molecular sieves: influence of solution pH, pore volume, and pore diameter. **Journal Physical Chemistry B**, v. 109, p. 6436-6441, 2005.

VITOLO, M. **Aplicação de Enzimas na Tecnologia de Alimentos**, In: AQUARONE, E.; BORZANI, W. SCHMIDELL, W e LIMA, U. A. Biotecnologia Industrial. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, p. 387-418, 2001.

WHITAKER, J. R. **Principles of Enzymology for the Food Sciences**. Zaragoza: Ed. Acribia, 1994.

YU, X.W.; LI, Y.Q. Kinetics and thermodynamics of synthesis of propyl gallate by mycelium-bound tannase from *Aspergillus niger* in organic solvent. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 40, p. 44-50, 2006.

ZHOU, Q. Z. K.; CHEN, X. D. Immobilization of β -galactosidase on graphite surface by glutaraldehyde. **Journal of Food Engineering**, v. 48, p. 69-74, 2001.